



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Farmacia

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**LA SPONDILITE ANCHILOSANTE:  
Impatto, Genomica, Asse Interleuchina e  
Biomarcatori**

*Candidata:*

**Gaia Notini**

*Relatori:*

<b>Prof.ssa</b>	<b>Maria Rosa Mazzoni</b>
<b>Prof.</b>	<b>Antonio Lucacchini</b>

Anno Accademico 2015-16

*A mio padre Amerigo e a mia madre Silvia  
che mi hanno permesso di arrivare fino a qui  
sostenendomi ogni giorno,  
alle mie sorelle Elisa e Anna a cui voglio un mondo di bene,  
al mio nipote "Davidone,  
a Alessio che mi riempie da tanti anni con il suo amore,  
ad Elisabetta, la mia guida e sostegno nella preparazione,  
ed infine alle amiche di sempre Francesca, Claudia, Agnese,  
Alessandra, e tantissime altre che spero lo saranno sempre,  
ed al Prof. Pier Luigi Giorgi, che, con la intuizione delle ns. malattie  
ci ha permesso di crescere e diventare quelle che siamo.*

## INDICE

<b>CONSIDERAZIONI PERSONALI</b>	Pag.	5
<b>CAPITOLO 1</b>		
INTRODUZIONE	Pag.	6
1.1 Descrizione	Pag.	7
1.2 Quadro Clinico	Pag.	8
1.3 Diagnosi	Pag.	10
1.4 Terapia	Pag.	11
<b>CAPITOLO 2</b>		
<b>Impatto della “SA” in ambito sociale e sul lavoro – risultati delle ultime ricerche</b>	Pag.	13
2.1 Impatto sulla produttività lavorativa	Pag.	14
2.2 Sensibilizzazione riguardo la produttività lavorativa	Pag.	17
2.3 Strumenti per misurare l'impatto della SA sul lavoro	Pag.	20
2.4 Consulenza e supporto del lavoro	Pag.	27
2.5 Effetti dei trattamenti biologici sulla produttività Lavorativa	Pag.	32
2.6 Sviluppi futuri	Pag.	33
<b>CAPITOLO 3</b>		
<b>Genomica della Spondilite anchilosante (SA)</b>	Pag.	36
3.1 Premesse e sistema HLA-A e HLA-B nell'uomo	Pag.	37
3.1.1 Genetica e sierologia	Pag.	37
3.1.2 Struttura	Pag.	39
3.1.3 Geni	Pag.	40
3.1.4 Sottoregione DR	Pag.	40
3.1.5 Sottoregioni DQ e DP	Pag.	40
3.1.6 Regione HLA	Pag.	41
<b>CAPITOLO 4</b>		
<b>Genomica integrata – risultati delle ultime ricerche</b>	Pag.	42
4.1 Convergenza della SA con percorsi di malattie autoimmuni	Pag.	43
4.2 Risultati	Pag.	46
4.2.1 Sovrapposizione di geni associati a rischio di SA	Pag.	46
4.2.2 Misura di selezione purificante per geni associati a rischio autoimmune	Pag.	47
4.2.3 Abbondanza della trascrizione di geni associati a rischio MA	Pag.	48
4.2.4 Espressione proteica	Pag.	50
4.2.5 Analisi dei percorsi di arricchimento	Pag.	52
4.2.6 Rete di interazione proteina-proteina	Pag.	53
4.3 Discussione	Pag.	56
4.4 Metodi	Pag.	60
4.4.1 Recenti mutazioni deleterie in geni associati a rischio del SI	Pag.	60
4.4.2 Carico di recenti mutazioni deleterie in geni associati a rischio del sistema immunitario	Pag.	60
4.4.3 Abbondanza di trascritti di geni associati a rischio di MA	Pag.	61
4.4.4 Espressione proteica dello sviluppo umano	Pag.	62
4.4.5 Analisi di arricchimento del gene	Pag.	63

4.4.6	Test di permutazione	Pag.	65
4.4.7	Analisi Q-PCR e Western Blot	Pag.	66

## **CAPITOLO 5**

### **L'asse Interleuchina (il) -23 / il-17 nella SA: nuovi progressi e potenzialità per il trattamento**

		Pag.	67
5.1	Generalità	Pag.	68
5.2	SA ed altre malattie infiammatorie autoimmuni	Pag.	68
5.3	Risposte Th17 e l'asse IL-17/23	Pag.	71
5.4	Le risposte Th17 in malattie infiammatorie autoimmuni	Pag.	74
5.5	Patogenesi della SA	Pag.	74
5.6	Le risposte Th17 nella spondilite anchilosante	Pag.	77
5.7	Gestione della SA	Pag.	80
5.8	Le attuali strategie che mirano alle risposte Th17 in SA	Pag.	80
5.9	I rischi delle terapie che mirano all'asse IL-17/23	Pag.	83
5.10	Il futuro del trattamento nella SA	Pag.	83

## **CAPITOLO 6**

### **Biomarcatori per la diagnosi, il monitoraggio della progressione, le risposte di trattamento nella SA – risultati delle ultime ricerche**

		Pag.	84
6.1	Generalità	Pag.	85
6.2	Marcatori genetici	Pag.	88
6.2.1	HLA-B27	Pag.	88
6.2.2	Geni non-MHC	Pag.	89
6.3	Marcatori dell'attività della malattia	Pag.	92
6.3.1	La velocità di eritrosedimentazione (VES) e la proteina C-reattiva (PCR)	Pag.	92
6.3.2	Citochine	Pag.	93
6.3.3	Metalloproteinasi della matrice	Pag.	94
6.3.4	Osteoprotegerina (OPG)	Pag.	95
6.3.5	Glicoproteina-39 della cartilagine umana (HC gp-39, altrimenti nota come YKL-40)	Pag.	95
6.3.6	Proteina oligomerica della matrice cartilaginea (COMP)	Pag.	95
6.3.7	Aggrecano	Pag.	96
6.3.8	Calprotectina	Pag.	96
6.4	Marcatori della gravità della progressione radiografica	Pag.	99
6.4.1	Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)	Pag.	100
6.4.2	Filamenti proteici circolanti da degradazione del tessuto cartilagineo e connettivo	Pag.	100
6.4.3	Sclerostina	Pag.	102
6.4.4	Proteine wnt	Pag.	103
6.4.5	Osteocalcina	Pag.	103
6.4.6	Fosfatasi alcalina ossea (BAP)	Pag.	104
6.4.7	Fetuin-A	Pag.	104
6.4.8	Adipochine	Pag.	105

## **CONCLUSIONI**

### **RIFERIMENTI Bibliografici e a pubblicazioni**

Pag.	106
Pag.	108

## **CONSIDERAZIONI PERSONALI E STUDI EFFETTUATI**

Ho due sorelle:

- ✓ Elisa (la maggiore) di tre anni più grande (laureata in Ingegneria),
- ✓ Anna (la minore) di quattro anni più piccola (laureata in Infermieristica , Laurea triennale)

Tutte e tre abbiamo una malattia associata alla genetica, i nostri genitori no, o almeno non ancora ne evidenziano le sintomatologie.

La Spondilite anchilosante (SA) è una malattia di questo tipo ed è per questo motivo che ho scelto, insieme al mio Relatore, di trattare delle recenti ricerche su questa malattia, sulla sua individuazione e sulla sua terapia farmacologica.

Ho esaminato e riportato nella tesi alcune recenti pubblicazioni relativi a ricerche sulla SA inerenti in particolare a:

- 1) Impatto nella qualità della vita sociale e lavorativa (CAP. 3),
- 2) Genetica integrata (CAP. 4),
- 3) Asse delle Interleuchine (CAP. 5),
- 4) Biomarcatori per la diagnosi e monitoraggio (CAP. 6);

che mi hanno ampliato le conoscenze e le implicazioni che potrà avere questa malattia sulle nostre vite.

## CAPITOLO 1

## **INTRODUZIONE**

## 1.1 Descrizione

La Spondilite Anchilosante (SA) è una malattia infiammatoria cronica che colpisce principalmente le articolazioni sacro-iliache e la colonna vertebrale, ma che può coinvolgere anche le articolazioni periferiche. La SA, con l'artrite reattiva, l'artrite psoriasica, le artriti associate a malattie infiammatorie intestinali (*morbo di Crohn, rettocolite ulcerosa*) e le spondiloartriti indifferenziate, fa parte del gruppo delle spondiloartropatie (SpA).

Ha un'incidenza 3 volte maggiore nel sesso maschile, esordisce in genere in pazienti di età compresa tra i 20 e i 40 anni ed è 10-20 volte più frequente in parenti di primo grado di pazienti con SA, rispetto alla popolazione generale. Non si conoscono ancora le cause della SA.

La presenza dell'aplotipo HLA(human leukocyte antigens) B27 (*è un gene, quindi ereditato da uno o entrambi i genitori*) è strettamente associato alla malattia.

La maggior parte dei pazienti con SA ha questo carattere genetico, che tuttavia è riscontrabile anche in persone della popolazione generale sana senza spondilite.

L'HLA-B27 da solo non causa la malattia e solamente il 5% delle persone che hanno l'HLA B27 sviluppano la SA.

La SA non è una malattia ereditaria. I nati da soggetti con SA hanno solamente un rischio aumentato di ammalarsi di questa malattia articolare.

I fattori genetici giocano un ruolo importante nella suscettibilità alla Spondilite anchilosante (SA).

L'HLA-B27, un allele del locus HLA-B nella regione di classe I del

complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), si pensa che svolga un ruolo centrale nella patogenesi della malattia.

Sebbene la patogenesi esatta non sia ancora chiara, esistono una serie di teorie (Figura 1).

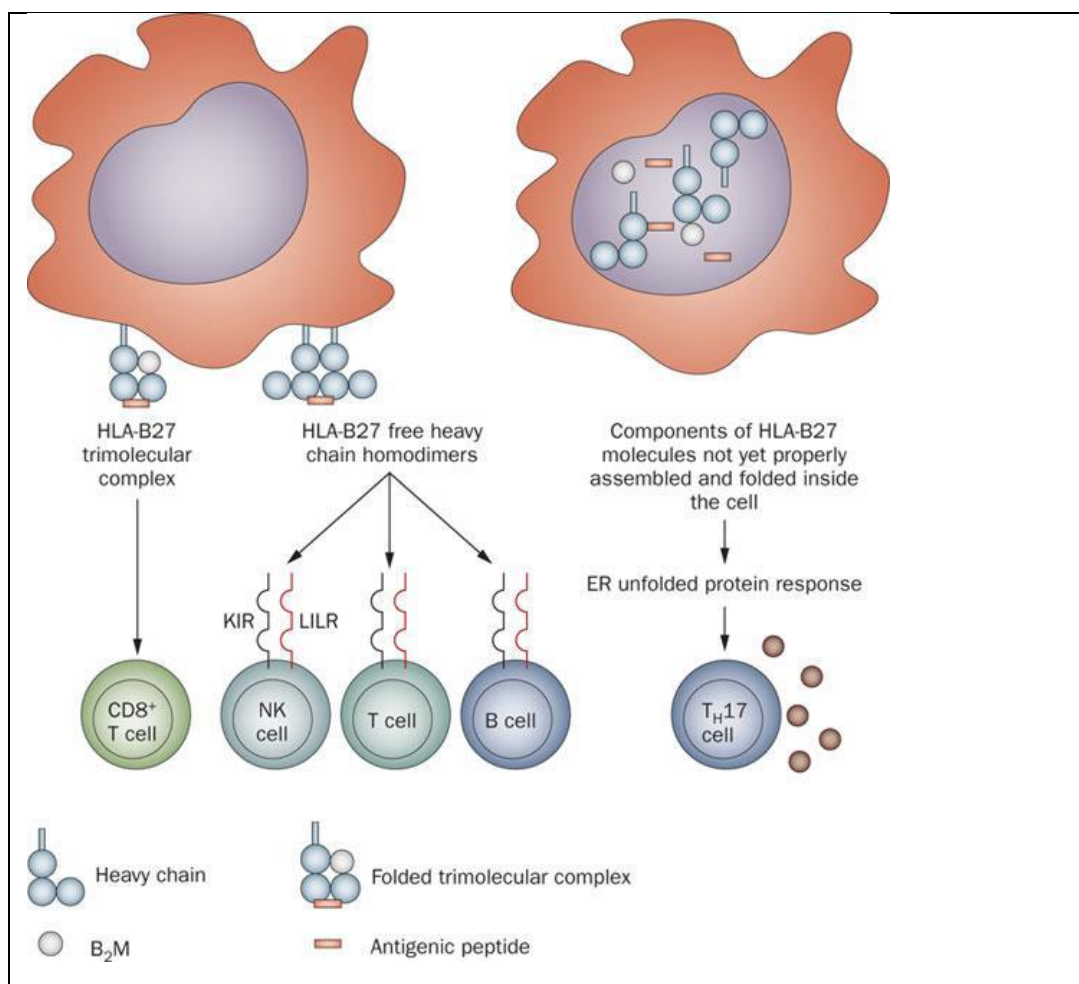


Figura 1 -

## 1.2 Quadro Clinico

Il sintomo d'esordio più frequente è il dolore al rachide lombare (*lombalgia*), con le caratteristiche del dolore infiammatorio: prevalentemente notturno, peggiora con il riposo e migliora con il movimento, si associa a rigidità mattutina. Il miglioramento del dolore



con il movimento è un elemento distintivo rispetto alle forme degenerative del rachide (*artrosi*) e alle discopatie, dove viceversa il movimento e lo sforzo possono rappresentare elementi scatenanti o peggiorativi del dolore. Il paziente descrive il dolore lombare come “fastidio”, “fasciatura”, “senso di costrizione” di intensità variabile; nella maggior parte dei casi il dolore è irradiato alla natica e comunque in una vasta zona del bacino (*glutalgia*) o fino al ginocchio (*sciatica mozza*). Altro sintomo è il dolore toracico che si accompagna ad una riduzione dell’espansibilità del torace, dovuto all’interessamento diffuso delle strutture costo-vertebrali o costo-sternali. Sintomi sistemici come febbre, stanchezza, riduzione dell’appetito, perdita di peso, rappresentano altre manifestazioni della SA.

Può essere presente una artrite periferica che in genere interessa in modo asimmetrico le grandi articolazioni degli arti inferiori, come il ginocchio o la caviglia. L’infiammazione nella SA può anche interessare il sito di inserzione dei tendini dell’osso determinando dolore e/o tumefazione nella porzione posteriore e inferiore del calcagno.

Nel lungo termine l’infiammazione della colonna vertebrale può determinare la completa fusione della colonna stessa determinando nel paziente un profondo grado di disabilità.

In alcuni pazienti sono riscontrabili anche manifestazioni extrarticolari, come quelle oculari caratterizzate da episodi ricorrenti di arrossamento, dolore e ipersensibilità alla luce.

L’infiammazione dell’occhio richiede una precoce diagnosi e un adeguato trattamento da parte di un oculista per prevenire il danno oculare.

### 1.3 Diagnosi

La diagnosi di SA dipende da una attenta storia clinica e dall'esame fisico.

Due elementi della storia clinica sono di grande importanza:

- ✓ la presenza di dolore con le caratteristiche della forma infiammatoria e la rigidità del tratto inferiore della colonna vertebrale,
- ✓ una storia familiare positiva per SA.

Il dolore del tratto inferiore della colonna vertebrale è molto comune nella popolazione generale ed è solitamente dovuto a cause “meccaniche” non infiammatorie come l'artrosi o l'ernia discale, ma il dolore tipico della SA ha le caratteristiche della forma infiammatoria.

La presenza di una lombalgia infiammatoria è l'elemento chiave per la diagnosi di SA. Inoltre, una storia familiare positiva per SA (*in particolare un parente di primo grado affetto da SA*) aumenta la probabilità di avere tale malattia in un paziente con lombalgia infiammatoria.

Anche se la diagnosi di SA non richiede solitamente la determinazione dell'HLA-B 27, tale test può essere utile a fini diagnostici.

Però una diagnosi certa di SA richiede la presenza di evidenza radiologica ad una radiografia del bacino di infiammazione delle articolazioni sacroiliache.

Tali alterazioni radiologiche compaiono però dopo 3-5 anni di malattia, perciò non sono utili per fare una diagnosi precoce di SA.

La risonanza magnetica delle articolazioni in fase precoce è più utile e

attualmente tale metodica di immagine è frequentemente utilizzata nella diagnosi di SA.

Gli altri esami del sangue non sono utili per la diagnosi di SA; talvolta sono aumentati gli indici di infiammazione (*VES-PCR*).

#### 1.4 Terapia

La fisioterapia, le corrette abitudini posturali, i farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) sono alla base del trattamento del dolore e della rigidità causate dalla SA.

I FANS comunemente utilizzati sono il diclofenac, naproxene, piroxicam e di recente sono stati introdotti gli inibitori specifici della Cox-2 come celecoxib e etoricoxib.

I corticosteroidi e i farmaci anti-reumatici modificanti la malattia (*DMARDs*), quali la **Sulfasalazina**, il **Methotrexate**, sono attivi nel controllare i sintomi articolari periferici, ma non nei sintomi a carico della colonna vertebrale. Inoltre tali farmaci non hanno la capacità di rallentare l'evoluzione del danno alla colonna vertebrale. La terapia della SA si è recentemente arricchita di nuovi farmaci in grado di bloccare una sostanza chiamata Tumor necrosis factor alfa (*TNF-alfa*) responsabile del mantenimento della infiammazione nelle malattie articolari infiammatorie e quindi nella SA. Tali farmaci sono in grado di sopprimere l'infiammazione e quindi risolvere il dolore e probabilmente prevenire l'evoluzione del danno articolare.

La prima di queste molecole, sintetizzate mediante tecniche di biotecnologia genetica, è Infliximab, un anticorpo monoclonale chimerico che lega selettivamente il **TNFalfa** solubile rendendolo

inattivo. Vi sono evidenze che l'impiego di **Infliximab** nelle fasi iniziali del processo spondilitico, possa determinare una scomparsa dell'edema osseo evidenziato in risonanza magnetica a carico delle articolazioni sacroiliache e della colonna vertebrale, a testimonianza di una regressione del danno flogistico.

Oltre a Infliximab sono oggi disponibili altri farmaci biologici anti TNFalfa: **Etanercept**<sup>1</sup> che è il recettore antagonista del TNFalfa e **Adalimumab**, altro anticorpo monoclonale e due ultimi nuovi: **Certolizumab** e **Golimumab**.

L'**Etanercept**, 1 f a settimana (1f ogni 10 giorni dal 19/11/2015), è il farmaco biologico con cui viene curata mia sorella dal 16 settembre 2013, prima è stata curata con **Humira** (Adalimumab) 40mg (non un farmaco specifico per SA, bensì per “Artrite associata a entesite”, morbo di Crohn) , 1f ogni 15 giorni, dal 25 gennaio 2011 e 1 f a settimana dal 22 aprile 2013 per due mesi per poi tornare a 1f ogni due settimane. Nel frattempo la diagnosi è passata da Spondiloentesoartrite (dal 01/07/2010) a Spondiloartrite HLA-B27 positiva (05/12/2011) a Spondiloartrite Assiale HLA-B27 positiva (22/04/2013) fino a Spondilite anchilosante (SA) (16/09/2013) .

---

<sup>1</sup> È un farmaco per il trattamento di malattie a carattere autoimmune, che agisce modificando la risposta biologica dell'organismo, appartenente alla classe dei farmaci in grado di modificare il decorso della malattia (i cosiddetti DMARDs, dall'inglese Disease Modifying Antirheumatic Drugs), cioè una sostanza in grado di trasformare l'andamento e la storia naturale della malattia per la quale viene impiegata. È un composto derivato da DNA ricombinante, una immunoglobulina umana G1 (IgG1), un anticorpo monoclonale specifico ed interferente con l'attività del fattore di necrosi tumorale umano (TNF o TNF- $\alpha$ ). Come farmaco è indicato per la cura della psoriasi, dell'artrite psoriasica, dell'artrite reumatoide, della spondilite anchilosante e, potenzialmente, da qualsiasi altro processo mediato dal TNF $\alpha$ . In Italia il farmaco è venduto dalla società farmaceutica Pfizer con il nome commerciale di *Enbrel* nella forma farmaceutica di siringhe preriempite con 25 o 50 mg del composto.

## CAPITOLO 2

### **IMPATTO DELLA “SA” IN AMBITO SOCIALE E SUL LAVORO – RISULTATI DELLE ULTIME RICERCHE**

## 2.1 Impatto sulla produttività lavorativa

Questa ricerca è stata effettuata nel Regno Unito (UK) e pubblicata nel 2015 [215].

Date le caratteristiche della SA/SpA assiale, non sorprende che sia responsabile di notevoli costi diretti e indiretti socio-economici, disabilità lavorativa [9 e 11] e dell'impatto sulla qualità di vita [12, 13]. Il ritiro dal lavoro è tre volte più comune nelle persone con SA rispetto alla popolazione generale, andando dal 5% durante il primo anno di diagnosi ad oltre il 20% a 10 anni e 30% a 20 anni [9, 10]. Un terzo dei frequentatori dell'ospedale con SA rinunciano a lavorare prima dell'età pensionabile e altri modificano o riducono il lavoro [7].

Il cinquanta per cento delle persone con SA sperimenta instabilità lavorativa, mentre il 15% riduce o cambia il proprio lavoro a causa della SA. Sia i fattori fisici che psicosociali hanno un ruolo importante, come la perdita del lavoro associata con una maggiore età, più lunga durata della malattia, minor rendimento scolastico, comorbidità<sup>[2]</sup>, maggiori handicap fisici, dolore, fatica, rigidità, ansia, depressione e bassa autostima [7].

Tutto questo porta a costi personali e sociali significativi che aumentano sensibilmente con il diminuire delle funzioni [14].

Inoltre, le persone con SpA assiale non-radiografica vivono un simile carico della malattia e di impatto sulla HRQoL come quelli con SA affermata [2, 15].

La letteratura che affronta i fattori determinanti della produttività lavorativa in SA è scarsa.

---

<sup>2</sup> Il termine indica la coesistenza di più patologie diverse in uno stesso individuo.

Fino ad oggi, la maggior parte degli studi sono stati formulati come questionari [16, 24, 25, 33 e 34], e sono arrivati alla conclusione che i fattori determinanti sono complessi e multifattoriali.

I problemi identificati comprendono una vasta gamma di fattori socio-culturali, psicologici, coping<sup>3</sup>, stile di vita e occupazionali.

Le principali caratteristiche fisiche pertinenti alla capacità di una persona di continuare a lavorare sono la perdita di mobilità della colonna vertebrale e l'espansione del torace.

Molte persone affette da SA vivono un continuo declino della mobilità della colonna vertebrale, anche dopo 20 anni di malattia [17] indipendentemente dalla durata della malattia ed hanno riportato frequenza di esercizio non supervisionato [18]. Inoltre, l'incapacità di impedire la progressione della malattia porta circa il 40% delle persone a sviluppare una grave restrizione spinale [19].

Le persone possono quindi preoccuparsi del loro aspetto fisico, che potrebbe avere un impatto negativo sull'immagine corporea [12].

Inoltre, anche i fattori psicologici influenzano l'immagine corporea, rappresentando potenzialmente una differenza importante tra gli adulti con SA e gli adulti sani [20].

Sono stati segnalati timori per il futuro, incentrati intorno all'incertezza della progressione della malattia come la paura di essere in una sedia a rotelle, la coscienza di sé ed il brutto aspetto associati con i cambiamenti posturali della 'schiena curvata', che creano scarsa autostima, scarsa sicurezza di sé e scarsa immagine di sé [8].

Altre caratteristiche che possono influenzare le persone sul posto di

---

<sup>3</sup> Il termine indica le strategie cognitivo-comportamentali a disposizione della persona per far fronte ai problemi derivanti dal cattivo “fit” con l'ambiente.

lavoro sono il dolore e la rigidità, lo stare seduto in una posizione statica, i problemi di mobilità - che talvolta coinvolgono le articolazioni periferiche - e la stanchezza a causa di disturbi del sonno e / o fatica con conseguente impatto sulla capacità di concentrazione. Anche le caratteristiche psicologiche sono molto importanti.

Healey e colleghi [21] hanno identificato una serie di fattori legati allo stato di lavoro in SA, tra cui la depressione, fortemente associata con la disoccupazione, tra cui l'assenteismo ed il presenzialismo. Inoltre, la 'stigmatizzazione' dell'avere “mal di schiena” [22] potrebbe influenzare negativamente la volontà di rivelare i sintomi e le difficoltà lavorative ai dirigenti ed ai colleghi. Il posto di lavoro è un'arena difficile in cui per mantenere i rapporti, si cerca di rimanere “normali di fronte alle perturbazioni”. Ad esempio, i colleghi di lavoro possono essere riluttanti a ridistribuire i carichi di lavoro, e possono essere poco tolleranti di fronte alle frequenti assenze dal posto di lavoro [23].

È stato suggerito che la capacità lavorativa delle persone affette da SA nei decenni centrali della vita è simile a quella delle persone affette da artrite reumatoide [24].

Inoltre, l'incapacità di lavorare ha importanti conseguenze per l'individuo e la sua famiglia sia per via della perdita di guadagno che per via della perdita di autostima che una carriera ed il reddito forniscono.

Gli oneri finanziari e personali di vivere con SA sono sostanziali [25] tra cui il costo dei farmaci ed altri trattamenti, il regolare esercizio fisico, l'aumento dei premi assicurativi, e minori guadagni e diritti pensionistici, che alla fine possono portare a danni finanziaria.



Vi è anche un costo per la società a causa di una perdita potenziale dal posto di lavoro di quasi un terzo delle persone affette da SA. Molti individui con SA possono non riuscire a raggiungere la carriera scelta o soddisfare il loro potenziale [11]. Gli oneri finanziari includono la perdita di gettito fiscale da quei pazienti e assistenti che non sono in grado di lavorare, e il costo di pagare la pensione di invalidità e / o assegni di assistenza.

I costi diretti del trattamento includono primariamente i costi di cura e secondariamente quelli dei farmaci e dell'assistenza sociale, con costi per la collettività che aumentano a picco mentre la funzione fisica si deteriora.

## **2.2 Sensibilizzazione riguardo la produttività lavorativa**

Nel Regno Unito, la Società Nazionale della Spondilite Anchilosante (NASS) ha fatto una campagna per molti anni per sensibilizzare riguardo la SA/SpA assiale, ed ha dato un contributo significativo alle buone pratiche grazie al suo documento “Uno sguardo al futuro” [5].

All'interno di questo documento, il vivere e lavorare con SA viene evidenziato come un grosso problema.

La NASS ha cercato di aumentare la consapevolezza dell'impatto che il vivere con SA ha sulla capacità di lavorare, e ha sottolineato il ruolo del ritardo nella diagnosi e la mancanza di consapevolezza della condizione di familiari, amici e datori di lavoro.

Per citare Jane Skerrett, un ex direttore del NASS:

*“Queste ansie spesso si concentrano più acutamente sull'impatto dell'SA sul lavoro: sarai in grado di portare avanti il tuo ruolo*

*attuale? Come reagiranno il datore di lavoro ed i colleghi? Dovrai cambiare completamente il tuo lavoro o peggio ancora, dovrai rinunciare al lavoro del tutto?”*

Nel 2009, la NASS ha pubblicato un sondaggio dei loro membri sul “lavorare con SA” [26] in risposta alle loro preoccupazioni espresse circa l'occupazione.

La NASS ha distribuito un questionario a 1000 membri, ricevendo 324 risposte da parte di persone con una diagnosi corrente della SA.

Solo il 12% ha riferito che l'SA non aveva avuto alcun impatto discernibile sulla loro vita lavorativa, mentre un terzo ha riferito che erano in grado di svolgere meno compiti fisici o manuali sul posto di lavoro rispetto a prima della comparsa della SA.

I reperti hanno dimostrato che le persone non stavano ricevendo consigli utili da professionisti del settore sanitario o datori di lavoro su come affrontare la loro condizione di lavoro e che le questioni legate al lavoro spesso non sono state nemmeno discusse.

Molti hanno ritenuto che avevano aspettato troppo a lungo per ricevere una diagnosi, e questo ha avuto un impatto sulla loro produttività, mentre il trattamento efficace ha prodotto una significativa differenza sull'essere in grado di mantenere il posto.

Inoltre, le persone con una forma più grave della SA, hanno riportato un impatto maggiore sulla loro vita lavorativa, e quelli con attività di malattia più avanzata hanno evidenziato una probabilità di dichiarare che la loro vita lavorativa era stata colpita due volte più alta.

Il 61% si è dichiarato preoccupato circa l'impatto che avrebbe avuto il deterioramento della loro condizione sul lavoro o prospettive di occupazione, ed il 30% ha avuto preoccupazioni per le discriminazioni

a causa della loro condizione, sia da parte dei datori di lavoro che colleghi. Due terzi hanno riferito che a volte sono andati a lavorare nonostante la sensazione di malessere.

Coloro che consideravano i loro trattamenti utili hanno percepito meno ostacoli a rimanere nel mondo del lavoro rispetto a quelli il cui trattamento non funzionava bene. I primi avevano anche meno probabilità di riferire la presenza di dolore e fatica che influenzasse la loro capacità di lavorare ed avevano meno probabilità di avere bisogno di permessi per malattia.

In risposta al sondaggio, la NASS ha invitato un gruppo di esperti a sviluppare consigli ed un invito all'azione per le principali parti interessate, ovvero il governo, i medici di medicina generale, i reumatologi ed i datori di lavoro.

La relazione 'Salute 2020' [6] raccomanda che i datori di lavoro siano incoraggiati a sviluppare strategie per fare sì che le persone tornino al lavoro.

All'interno di questo, le piccole imprese dovrebbero essere incoraggiate a lavorare con le grandi organizzazioni per lo scambio di idee e delle buone pratiche.

Il rapporto suggerisce che “I datori di lavoro non dovrebbero ignorare le denunce di mal di schiena o guardarle con sospetto come una scusa dello scarso rendimento, anzi sarebbe importante per loro cercare di migliorare la vita lavorativa delle persone con condizioni di lungo termine, in modo che rimangano a lavorare.”

Le aree chiave alle quali i datori di lavoro dovrebbero dare maggiore attenzione sono state identificate come segue:

- ✓ Una formazione adeguata deve essere fornita ai collaboratori per

consentire loro di sostenere i lavoratori con condizioni di lungo termine.

- ✓ Deve essere adottato un approccio flessibile di progettazione e delle responsabilità del lavoro, che possa includere ore flessibili di lavoro, descrizioni delle mansioni modificate e politiche e procedure di assunzione inclusive. Sono stati evidenziati i benefici di consentire ai dipendenti con SA di fare brevi pause dal lavoro regolari per poter fare stretching ed esercizi.
- ✓ Gli operatori sanitari, devono essere attivamente impegnati quando un dipendente li avvisa della loro condizione, in modo che l'individuo rimanga un membro effettivo della forza lavoro senza sentirsi isolato.

La Work Foundation ha pubblicato un recente rapporto sull'impatto della SA sul lavoro nel Regno Unito [\[27\]](#), che ha evidenziato il potenziale che la SA/SpA assiale ha di disturbare significativamente o anche limitare la partecipazione dei giovani nel mercato del lavoro, aggiungendo che mantenere le persone con SA/SpA assiale nel mercato del lavoro porta importanti benefici clinici, sociali ed economici.

### **2.3 Strumenti per misurare l'impatto della SA sul lavoro**

Anche se il lavoro svolge un ruolo chiave nella vita delle persone con SA/SpA assiale, catturare l'impatto della condizione sulla capacità di lavoro di una persona non è attualmente un componente fondamentale della valutazione della salute, in parte perché vi è una scarsità di strumenti per misurare l'impatto sulla vita lavorativa.

Le linee guida internazionali, come quelle dall'Associazione canadese della reumatologia ed il Consorzio canadese della ricerca sulla spondiloartrite, raccomandano che il monitoraggio della malattia includa non solo le valutazioni della funzione, della disabilità e degli handicap, ma che anche le attività sociali, il tempo libero, l'educazione, la comunità e le attività lavorative siano delle misure integrali [ 28].

OMERACT ha anche rafforzato l'importanza della produttività lavorativa attraverso il Gruppo d'Interesse Speciale della Produttività Lavorativa [29].

Il questionario della Produttività Lavorativa ed Indebolimento dell'Attività in SA (WPAI: SpA) [37] è stato modificato dal questionario della Produttività Lavorativa ed Indebolimento dell'Attività (WPAI) [30], che è un questionario auto somministrato per valutare l'impatto della malattia sulla produttività, e che è stato convalidato per l'uso in molte condizioni a lungo termine, tra cui l'asma, la dermatite e la malattia di Crohn.

Il WPAI: SpA [37] valuta l'impatto della SA sul lavoro e altre attività quotidiane durante i 7 giorni precedenti.

Il questionario è composto da sei domande che aiutano a determinare:

- ✓ lo stato di occupazione,
- ✓ le ore perse dal lavoro a causa della SA,
- ✓ le ore perse dal lavoro per altri motivi,
- ✓ le ore effettivamente lavorate,
- ✓ il grado in cui SA influenza la produttività lavorativa durante il lavoro,
- ✓ la misura in cui SA influenze le attività al di fuori del lavoro.

Si ottengono quattro punteggi: la percentuale di assenteismo, la percentuale di presenzialismo (riduzione della produttività durante il lavoro), un punteggio di valore complessivo di indebolimento del lavoro che combina l'assenteismo e presenzialismo e la percentuale di indebolimento delle attività svolte al di fuori del lavoro.

Le questioni relative all'assenteismo ed al presenzialismo sono applicabili solo alle persone impiegate.

I punteggi più alti indicano maggiore perdita.

La convalida del WPAI:SpA è stata intrapresa nel contesto di un trial clinico di 24 settimane randomizzato in doppio cieco di una terapia biologica in pazienti con SA [37].

La validità discriminante di WPAI:SpA includeva i punteggi dell'assenteismo, del presenzialismo, della perdita complessiva di produttività lavorativa e dell'indebolimento delle attività, che sono stati valutati relativi agli “outcomes”<sup>[4]</sup> comunicati dal paziente.

Questo strumento è stato utilizzato principalmente all'interno di studi clinici, ma è stato recentemente inserito anche come una delle misure di “outcome” all'interno dello strumento online “Parlare dell'SA” sponsorizzato dall'industria progettato per rendere il monitoraggio dell'SA più semplice e veloce.

Anche se fornisce dati sull'assenteismo e la produttività, questa misura non fornisce alcuna indicazione di come la capacità di lavorare viene influenzata dalla condizione, ed esegue le valutazioni di solo un periodo di 1 settimana. Inoltre, è stata sviluppata prima che si fosse evoluto il concetto più recente della SpA Assiale non radiografica, ed è valida solo se una persona fa parte del mondo del lavoro.

---

<sup>4</sup> Nella metodologia della ricerca clinica ha il significato di “misura di esito”.

Instabilità del lavoro (WI) comprende il periodo precedente alla disabilità lavorativa (WD), ed è definita come le conseguenze di una mancata corrispondenza tra la capacità funzionale di una persona e le esigenze richieste dal proprio lavoro, che possono minacciare l'occupazione [31].

Pertanto, riconoscendo precocemente la WI si potrebbe ridurre o eliminare il rischio di disabilità lavorativa.

La Scala Instabilità Lavorativa per l'Artrite Reumatoide (RA-WIS) è stata convalidata per l'SA (SA-WIS) [32] come un questionario auto-gestito per identificare quelli a rischio di problemi di instabilità lavorativa e disabilità lavorativa, e anche per indicare se sono state indicate terapie biologiche. È un questionario di 20 item, molte delle domande sono in comune con l'originale RA-WIS.

Ci sono valori limite per definire un livello basso (<11), medio (da 11 a 18) ed alto (da 19 a 20) di instabilità lavorativa.

Tuttavia, l'SA-WIS è stata sviluppata solo da una piccola dimensione del campione, e la sua validità predittiva per il mantenimento di posti di lavoro rimane sconosciuta [33, 34].

Un esempio più recente è il Sondaggio della Produttività Lavorativa specifico dell'artrite (WPS), che è stato convalidato per valutare i limiti di produttività associati con l'artrite sia all'interno che all'esterno della casa [35].

Questo strumento valuta le limitazioni di produttività nella SpA assiale, tra cui SpA assiale non radiografica e SA, e come la WPAI e SA-WIS è stato precedentemente convalidato su altre condizioni (artrite reumatoide e artrite psoriasica). Le proprietà psicometriche sono state valutate utilizzando i dati dello studio RAPID-axSpA.

Il WPS è un questionario specifico della malattia progettato per valutare l'impatto dell'artrite sulla produttività sul posto di lavoro ed in famiglia, così come le attività giornaliere durante il mese precedente.

Il questionario viene somministrato da un intervistatore oppure auto-somministrato, e copre un periodo di 1 mese [36].

Il primo elemento del WPS affronta l'attuale partecipazione al mercato del lavoro (occupazione fuori casa), oltre a fornire dati normativi e di confronto sullo stato occupazionale (non lavorare implica la perdita completa di produttività a pagamento).

Due item catturano l'assenteismo (giorni di lavoro persi) ed il presenzialismo (giorni con produttività ridotta di almeno la metà) a causa dell'artrite, e due item catturano gli stessi concetti, ma si applicano al lavoro non retribuito (domestico).

Ulteriori item catturano la stima della misura in cui l'artrite ha interferito con la produttività lavorativa (retribuita e non) su una scala da 0 e 10 (0 = nessuna interferenza e 10 = interferenza completa), il numero di giorni nel il mese passato che è stato richiesto un aiuto esterno a causa dell'artrite, e il numero di giorni nel mese passato che non vi sono state attività in famiglia, sociali o di tempo libero a causa dell'artrite.

Anche se raccomandato per l'uso sia in studi clinici e che nella pratica clinica, gli autori sottolineano che non esiste uno standard di riferimento per la valutazione della produttività dei lavoratori affetti da SpA assiale. Essi, tuttavia, affermano che i risultati della convalida sono in linea con precedenti lavori effettuati per il questionario WPAI nella sotto-popolazione SA.

In questo studio, è stato osservato che le persone con una maggiore



gravità della malattia (BASDAI) vivono una maggiore compromissione del lavoro, presenzialismo e compromissione nelle attività quotidiane; tuttavia, l'assenteismo non è significativamente diverso tra le persone con problemi di salute peggiori e quelli con una salute migliore [37].

Un avvertimento per la convalida di WPS è che probabilmente nel gruppo studiato la malattia era più attiva rispetto a quanto lo sarebbe stato in un gruppo reclutato dalla popolazione più rappresentativo.

Misure generiche che sono state utilizzate negli studi di ricerca includono anche il Questionario delle Limitazioni a lavoro (WLQ) [38].

Questa misura è stata sviluppata per misurare come i problemi di salute stanno interferendo con specifici aspetti delle prestazioni lavorative e l'impatto sulla produttività di queste limitazioni.

Il questionario è raccomandato per l'uso in studi clinici, dai datori di lavoro e professionisti della salute per le persone impiegate con patologie croniche.

Ci sono cinque scale: domande sulla gestione del tempo (composto da 5 item che affrontano la difficoltà nel gestire il tempo e programmare le richieste), sulle esigenze fisiche (contiene sei item che coprono la capacità di una persona di svolgere compiti di lavoro che coinvolgono la forza fisica, la resistenza, il movimento, il coordinamento e la flessibilità), mentali/interpersonali (nove item che valutano le attività di lavoro cognitivo e le interazioni sociali sul posto di lavoro) e sugli esiti (5 item riguardanti la ridotta quantità e qualità del lavoro).

I punteggi della scala vanno da 0 (nessuna limite) a 100 (limitato tutto il tempo).

Il punteggio rappresenta la quantità di tempo nelle ultime 2 settimane che le persone sono state limitate durante il lavoro.

Oltre al punteggio della scala, può essere calcolato un punteggio totale dell'indice WLQ e convertito in una stima della perdita di produttività, e questo punteggio può essere paragonato al dipendente 'sano' (punteggio normale).

Sebbene vi sono diversi strumenti disponibili per misurare la perdita di produttività retribuita, essi sono associati con importanti limiti metodologici, specialmente nel contesto di studi clinici di terapie biologiche [39].

Verstappen et al. [39] hanno suggerito come i test clinici potrebbero studiare maggiormente l'impatto delle terapie sulla capacità di lavorare, ad esempio, regolando i risultati per possibili fattori confondenti e attraverso l'uso obbligatorio di gruppi di controllo negli studi osservazionali. Inoltre, hanno sottolineato anche l'importanza dei fattori contestuali relativi alle caratteristiche del lavoro e l'organizzazione nella comprensione della partecipazione al lavoro.

La proposta della Organizzazione Mondiale della Sanità del modello bio-psico-sociale può affrontare più adeguatamente l'impatto delle malattie croniche nei luoghi di lavoro in termini di perdita di produttività e di disabilità [40].

All'interno di questo modello, la conseguenza della sintomatologia della malattia e l'impatto sulla capacità funzionale sono integrate da aspetti psicosociali tra cui i fattori personali (livello di istruzione, di vulnerabilità, di “coping<sup>5</sup>”, credenze sulla salute e il lavoro e la

---

<sup>5</sup> Il concetto di *coping*, che può essere tradotto con “fronteggiamento”, “gestione attiva”, “risposta efficace”, “capacità di risolvere i problemi”, .. . Gli orientamenti più recenti

soddisfazione sul lavoro) ed anche da fattori ambientali (tipo di lavoro, supporto sociale, la compensazione del congedo per malattia, adattamento del posto di lavoro, orario di lavoro flessibile e potenziale aiuto dai colleghi).

I fattori di contesto sono complessi, e variano molto tra le occupazioni e gli individui, ma esistono questionari validati come il questionario del contenuto del lavoro basato sul modello sforzo-richiesta [41], ed il questionario dello squilibrio sforzo-ricompensa sulla base del modello eponimo [42].

Un recente studio per comprendere il ruolo dei fattori contestuali legati al lavoro in SA ha suggerito che sia i fattori relativi alla salute che quelli contestuali contribuiscono alle limitazioni lavorative nei pazienti con SA e che ulteriori opportunità di miglioramento dovrebbero essere affrontate all'interno dell'ambiente di lavoro [43].

## **2.4 Consulenza e supporto del lavoro**

I consigli legati al lavoro dati a persone affette da SA/SpA assiale generalmente includono il mantenere una postura corretta, evitare di lavoro o stare seduti in posizioni curve, evitare di raggiungere in alto sopra la testa se è presente una postura cifotica, adattare l'ambiente di lavoro ed includere tastiere elevate e monitor con schermi a livello degli occhi, utilizzare sedie corrette ergonomicamente per supportare l'intera colonna vertebrale e richiedere ore più flessibili se la fatica crea problemi.

Potrebbero essere dati anche consigli sulle tecniche di sollevamento e

---

considerano il *coping* come un processo che nasce da interazioni che superano o sfidano le risorse di un soggetto.

consigli generali della cura della schiena.

La relazione 'Spondiloartropatia e Lavoro' [27] ha sottolineato che gli adeguamenti del posto di lavoro, le modalità di lavoro flessibili, gli esercizi fisici e la fisioterapia possono aiutare a raggiungere questo obiettivo.

Per comprendere ulteriormente le aree in cui sono necessari consigli sul lavoro per le persone con SA/SpA assiale, nel 2013 la NASS ha condotto un sondaggio sui suoi membri nel Regno Unito. In 1630 hanno risposto al sondaggio.

Nelle tabelle seguenti (Tabelle 1 – 3) sono riportati i risultati percentuali delle risposte date ad ogni domanda.

Tabella 1

Are you currently in employment? (Sei attualmente nel mondo del lavoro?)	
Yes, full time (SI, a tempo pieno)	39%
Yes, part time (SI, a tempo parziale)	14%
No, in education (NO, in formazione)	1%
No, full-time parent (NO, genitore a tempo pieno)	2%
No, retired (NO, pensionato)	29%
No, not able to work due to health (NO, non in grado di lavorare per motivi di salute )	15%

Tabella 2

What impact, if any, do you think your AS has had on your working life? (Quale impatto, se del caso, pensi che la SA ha avuto sulla tua vita lavorativa?)	
Had a very negative impact (Ha avuto un impatto molto negativo)	35%
Had a slightly negative impact (Ha avuto un impatto leggermente negativo)	42%
Has not really impacted either way (Non ha avuto influenza in entrambi i casi)	14%
Had a slightly positive impact (Ha avuto un impatto leggermente positivo)	2%
Had a very positive impact (Ha avuto un impatto molto positivo)	4%
Do not know/not sure (Non so/non sono sicuro)	3%

Tabella 3

Which would you say comes closest to your feelings about your current household income? (Quale diresti che più si avvicina ai vostri sentimenti riguardo il reddito corrente della tua famiglia?)	
Living really comfortably on current income (Vivo in modo davvero confortevole con il reddito corrente)	9%
Living comfortably on current income (Vivo in modo confortevole con il reddito corrente)	32%
Neither comfortable nor struggling (Né in modo confortevole nè dovendo lottare)	33%
Struggling on current income (Vivo dovendo lottare con il reddito corrente)	14%
Really struggling on current income (Faccio veramente fatica con il reddito corrente)	7%
Do not know/prefer not to answer (Non so/Preferisco non rispondere)	6%

Di conseguenza, la campagna di NASS richiedeva a NHS di riconoscere importanti questioni della SA collegate al lavoro, tra cui

incoraggiare gli operatori sanitari a discutere questioni di lavoro durante gli appuntamenti di routine.

NASS sostiene fortemente che le persone con SA abbiano anche regolare accesso alle competenze di terapisti occupazionali.

La pubblicazione del Collegio dei Terapisti Occupazionali “Lavorare per la terapia occupazionale della salute e come aiutare la propria organizzazione” [44] evidenzia come la base di conoscenza unica della professione riguardo l'occupazione e le loro competenze distintive permette ai terapisti occupazionali di svolgere un ruolo centrale nella fornitura di riabilitazione professionale e consente ai dipendenti di continuare a lavorare.

Nel 2014, NASS ha pubblicato l'opuscolo “Gestione della SA a lavoro: risposte e consigli pratici”, che è la prima risorsa autorevole nel Regno Unito che fornisce informazioni pratiche riguardanti il posto di lavoro, compreso il modo di parlare della SA al lavoro e come stare bene al lavoro.

Inclusi in questo opuscolo vi sono le raccomandazioni per le valutazioni del posto di lavoro, mantenere una buona postura, rimanere attivi, dare una priorità ai compiti e tecniche di stimolazione.

Viene anche citata la Legge sulla Parità 2010 per i consigli di prendere del tempo libero per le visite mediche.

Ancora più importante, vi è stato incluso la “Guida dei datori di lavoro”, che descrive cos'è SA, come SA può influenzare la vita lavorativa di una persona e in che modo i datori di lavoro possono fornire supporto, e si sottolinea che SA è incluso all'interno della Legge sulla Parità 2010.

L'Associazione SA in Irlanda (ASAI) fa parte della coalizione Adatti a

Lavorare (Fit for Work), e pubblica anche un libro di sostegno per le persone che vivono con l'SA, chiamato SUAS (Supportare & Capire SA), che comprende una sezione su come lavorare con SA [45].

Attualmente, nel Regno Unito, i medici emettono una “nota di idoneità per il lavoro” per i pazienti in modo da fornire prova dei consigli che hanno dato circa l'essere idonei a lavorare. Questo permette al medico di registrare i dettagli degli effetti funzionali delle condizioni dei loro pazienti in modo che il loro datore di lavoro possa prendere in considerazione modi per aiutarli a tornare al lavoro.

L'Advisory Fitness for Work Report è stato sviluppato dalla Federazione delle Professioni Sanitarie Alleate (AHPF) [46] avvalendosi delle competenze degli organi professionali del Regno Unito di fisioterapia, terapia occupazionale e podologia.

Il rapporto ha l'obiettivo fondamentale di consentire alle persone di continuare a lavorare in modo sicuro o per quanto possibile tornare a lavorare.

Il rapporto valuta le difficoltà funzionali sia in impostazioni cliniche che sul posto di lavoro per fornire le soluzioni più adeguate, e dovrebbe essere completato con l'assistenza di un AHP opportunamente qualificata.

Esso affronta gli aspetti del ritorno graduale, delle ore alterate, i doveri modificati e la valutazione sul posto di lavoro con l'accordo dei datori di lavoro.

Vi è anche l'accento su specifiche difficoltà legate al lavoro riferite dal paziente con impostazione dei consigli e degli obiettivi sul posto di lavoro. Tuttavia, è classificato come 'consiglio' e non è un sostituto per la dichiarazione di idoneità per il lavoro.

La recente relazione “Salute 2020” [6] consiglia che una guida pratica su come gestire il mal di schiena infiammatorio sul posto di lavoro dovrebbe essere disponibile come parte dell'iniziativa governativa su Salute, Lavoro e Benessere.

Essa comprende un esempio di come Chartered Society of Physiotherapy (CSP) sta sviluppando un percorso, con 'il ritorno al lavoro' come risultato principale.

La terapia cognitivo-comportamentale (CBT) costituisce un componente chiave di questo percorso, riflettendo un crescente riconoscimento che gli individui possono avere problemi di salute mentale, come ansia e depressione, di fronte alla prospettiva di tornare al lavoro, mentre gestiscono questa condizione a lungo termine.

## **2.5 Effetti dei trattamenti biologici sulla produttività lavorativa**

Mentre la consapevolezza e la comprensione della SA/SpA assiale sono cresciuti significativamente negli ultimi anni, insieme con i progressi nella sua gestione e monitoraggio, un ulteriore impulso per migliorare i risultati è stato offerto dall'introduzione di trattamenti biologici per specifici sottogruppi di pazienti, per i quale è stata ampiamente dimostrata l'efficacia in diversi studi multicentrici su larga scala [3 e 4].

Chiaramente, i trattamenti biologici offrono un forte potenziale per gli individui che ne possono beneficiare significativamente in termini di maggiore produttività lavorativa, e grandi studi di coorte sono attualmente in corso per determinare se tale beneficio è anche dimostrabile a livello dell'intera popolazione.



## **2.6 Sviluppi futuri**

I recenti progressi ed i quadri emergenti della politica e le migliori pratiche offrono interessanti opportunità per fare ulteriori progressi significativi, e costruire sulle fondamenta che sono state ora messe in atto.

Vi è un chiaro potenziale per stabilire sistemi robusti ed efficaci per consentire alle persone affette da SA/SpA assiale di realizzare il loro pieno potenziale di produttività lavorativa, supportati da operatori sanitari e datori di lavoro.

Ciò comporterà che incorporare saldamente l'importanza del 'lavoro' nella clinica e nella pratica, ed il paradigma emergente di 'salute e cura personalizzati', che viene sempre più applicato in altri settori della sanità, può offrire un quadro adeguato e utile entro il quale poter sviluppare questo approccio.

C'è una continua necessità di sviluppare una più profonda comprensione di fattori determinanti della produttività del lavoro e la soddisfazione del lavoro, magari attraverso un più ampio utilizzo di metodologie di ricerca qualitativa, e impegnando pazienti e gruppi pubblici nella progettazione di tali studi. Ad esempio, questo potrebbe contribuire a garantire l'identificazione e l'uso di indicatori di risultato chiave che sono di primaria importanza per le persone affette da questa condizione.

Ci sono anche ottime opportunità per sfruttare le potenzialità offerte da trattamenti e tecnologie avanzati per migliorare i risultati di lavoro. Oltre ad esplorare modi per sfruttare i benefici clinici dei trattamenti biologici a questo riguardo, vi è molto da guadagnare mediante

l'esplorazione di pensieri ed approcci innovativi riguardanti nuove tecnologie, dispositivi e metodi di lavoro, e attingendo da competenze ed esperienze rilevanti in molte altre discipline accademiche e cliniche.

Nel loro insieme, le crescenti opportunità di nuove soluzioni offrono motivi di ottimismo che le persone affette da SA / SpA assiale saranno sempre più in grado di partecipare pienamente e produttivamente in attività lavorativa.

SpA assiale / SA è una condizione infiammatoria cronica, e colpisce circa 200.000 persone nel Regno Unito il cui sintomo principale è il dolore alla schiena.

I nuovi criteri di classificazione ASAS consentono la diagnosi precoce di SpA assiale pre-radiologica, ma valutare l'impatto della SpA assiale sulla produttività lavorativa non è attualmente una componente fondamentale degli accertamenti sanitari di routine.

Non ci sono attualmente standard di riferimento per valutare l'impatto della condizione all'interno del posto di lavoro per via degli strumenti esistenti limitati.

WPAI: SpA, utilizzato principalmente negli studi clinici, valuta l'impatto della SA sul lavoro e altre attività quotidiane.

SA-WIS identifica quelli a rischio di problemi di instabilità lavorativa e disabilità lavorativa, e indica anche se possono essere indicate terapie biologiche.

WPS è artrite-specifico, ed è stato recentemente utilizzato per valutare l'impatto sulla produttività lavorativa ed in famiglia.

La consulenza ed il sostegno riguardo il lavoro da parte di un Team multidisciplinare (MDT) di fisioterapisti e terapisti occupazionali

costituiscono una parte importante della gestione della SpA assiale.

In aggiunta a questo, i datori di lavoro hanno bisogno di adottare un approccio flessibile ed impegnarsi proattivamente con gli operatori sanitari per consentire a queste persone di mantenere il posto di lavoro. I trattamenti biologici possono avere un impatto significativo sulla produttività lavorativa, oltre agli adattamenti del posto di lavoro, la flessibilità, gli esercizi fisici e la fisioterapia.

Valutare l'impatto della SA/SpA assiale nella produttività lavorativa è un “work in progress”, e molte domande rimangono senza risposta.

## CAPITOLO 3

# **GENOMICA DELLA SPONDILITE ANCHILOSANTE**

### 3.1 Premesse e sistema HLA-A e HLA-B nell'uomo

Nel 1958 Dausset descrisse il primo gruppo leucocitario umano, l'antigene Mac. Numerosi altri antigeni, descritti negli anni successivi, hanno rivelato la complessità del sistema di istocompatibilità umano, denominato HLA da *Human Leukocyte Antigen*. Numerose riunioni internazionali di lavoro hanno permesso l'individuazione di circa 100 antigeni differenti. Il sistema HLA è l'equivalente del sistema H-2 del topo al quale somiglia nella sua organizzazione. Le due prime sottoregioni individuate, HLA-A e HLA-B, contengono i loci maggiori codificanti per gli antigeni di classe I. La regione codificante per gli antigeni di classe II, denominata HLA-D, è situata alla sinistra della regione HLA-B (più vicina al centromero) ed è suddivisa in 3 sottoregioni HLA-DP, DQ e DR.

#### 3.1.1 Genetica e sierologia

I loci **HLA-A** e **HLA-B** comprendono rispettivamente almeno **28 e 47 alleli**. Esiste un terzo locus di classe I, HLA-C (meno importante dei loci A e B) localizzato fra HLA-A e HLA-B, con otto alleli, vicino all'HLA-B. Ciascuna molecola presenta numerosi determinanti antigenici<sup>[6]</sup> sia pubblici che privati. Alcuni determinanti pubblici sono portati dall'insieme delle molecole HLA; altri sono specifici delle molecole codificate in una sottoregione di classe I.

I determinanti privati sono caratteristici del prodotto di un allele in un

---

<sup>6</sup> **Determinante antigenico**: struttura presente sulla superficie dell'antigene, capace di combinarsi con una sola molecola di anticorpo. Nella nuova terminologia proposta da Jerne viene detto **epìtopo**, in opposizione al paràtopo che è l'anticorpo.

locus. Gli esperimenti di “*capping*”<sup>[7]</sup> simultaneo indicano che le specificità private e pubbliche sono ben associate su una sola molecola. I determinanti pubblici spiegano alcune delle reazioni crociate osservate fra antigeni HLA, essendo le altre dovute ad una semplice somiglianza strutturale.

Il complesso HLA è situato sul braccio corto del cromosoma 6, su un segmento sufficientemente breve perché tutti i geni HLA portati da un cromosoma siano generalmente trasmessi in blocco dai genitori ai figli. Ogni genitore trasmette una serie di geni, il cosiddetto *aplotipo*.

Gli alleli dei due aplotipi di un individuo sono espressi come tratti codominanti, cioè sono tutti espressi negli eterozigoti. Tutti gli antigeni HLA non sono ancora conosciuti. Le ricombinazioni fra i due principali loci sono rare (dell'ordine dello 0,5%).

Essendo il numero degli alleli in ciascun locus HLA elevato, gli aplotipi di classe I possibili raggiungono un numero considerevole (superiore a 1.700) e corrispondono a un numero di genotipi (associazione di due aplotipi) vicino a  $10^6$ .

Differenze importanti possono sussistere nella frequenza dei differenti alleli fra una popolazione e l'altra. Ad esempio, gli alleli HLA-A1 e HLA-B8 sono particolarmente frequenti nei Caucasoidi (che comprendono gli Europei), mentre il B21 è osservato soprattutto nei Mediterranei, le cellule Aw36, Aw43 e Bw42 nei Negroidi e gli alleli Aw33 e Aw34 in Indonesia.

Gli antigeni HLA-C sono i meno immunogenici e ciò spiega perché si attribuisce loro minore importanza nella tipizzazione tissutale.

---

<sup>7</sup> Il “*capping*” (letteralmente: mettere un cappuccio o cappello o capitello) è una delle tappe di maturazione del pre-mRNA a mRNA che consiste **nell'aggiunta di un "cappuccio"** di 7-metil guanosina al residuo 5-terminale.

### 3.1.2 Struttura

Le molecole antigeniche di classe I sono costituite da due catene polipeptidiche: una catena leggera identica per tutte le molecole, la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m), e una catena pesante che è responsabile della variabilità. La  $\beta$ 2m è una proteina di membrana di 12 kDa codificata da un gene situato sul cromosoma 15. Essa assicura il mantenimento della conformazione della catena pesante alla quale è legata in maniera non covalente. La sua sequenza aminoacidica presenta un'omologia marcata con il dominio<sup>[8]</sup> CH3 delle IgG e in minor grado con la regione costante delle catene leggere delle Ig e alcuni domini degli antigeni di istocompatibilità di classe I e II. La  $\beta$ 2m non è polimorfa.

La catena pesante è composta da tre segmenti: un segmento idrofilo extracellulare (residui 1-283), un segmento idrofobo transmembrana (284-307) e un segmento idrofilo intracellulare (308-312).

Il segmento extracellulare a sua volta si suddivide in tre domini  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 3 sulla base di omologie esistenti fra i tre domini, la  $\beta$ 2m e i domini costanti delle Ig.

I due primi domini sono nettamente più polimorfi del terzo.

La molecola HLA-A2 è stata recentemente cristallizzata, cosa che ha permesso di proporre un modello di organizzazione spaziale.

Gli studi di biochimica e di “*capping*” hanno mostrato che le tre sottoregioni HLA codificano per tre molecole distinte, HLA-A, B e C,

---

<sup>8</sup> **Dominio:** regione di omologia delle immunoglobuline, stabilizzata da un ponte disolfuro, che possiede un'autonomia termodinamica ed eventualmente funzionale. Si distinguono i domini VL e CL sulle catene leggere, VH, CH1, CH2 e CH3 sulle catene pesanti.

e che ciascuna molecola può portare almeno 3 o 4 epìtopi<sup>[18]</sup> distinti.

### 3.1.3 Geni

I geni DR $\alpha$  possiedono 5 esoni mentre i geni A $\alpha$  ed E $\beta$  del sistema H-2 del topo ne hanno 6. Il polimorfismo è essenzialmente localizzato a livello del 2° esone che codifica per il 1° dominio esterno del polipeptide. Sedici locus di classe II sono stati individuati, ma non sono tutti espressi.

### 3.1.4 Sottoregione DR

Il gene DRA, monomorfo, codifica una catena  $\alpha$  che si associa alla catena  $\beta$ 1 codificata dal gene B1 polimorfo (35 alleli) per formare un dimero  $\alpha\beta$ 1. Il gene DRB2 è uno pseudogene, il gene DRB3 è espresso solo nei soggetti DR3, 5, 6 o 8.

Il dimero  $\alpha\beta$ 3 corrisponde alla specificità supertipica DRw52 (4 alleli).

Analogamente il gene DRB4 è espresso solo nei soggetti DR4, 7 o 9 (specificità supertipica DRw53).

Infine, il gene DRB5 (4 alleli) è espresso solo nei soggetti DR2.

### 3.1.5 Sottoregioni DQ e DP

Esse comprendono ciascuna 2 geni  $\alpha$  e 2 geni  $\beta$ , essendo funzionale una sola coppia. Bisogna aggiungere a questi geni un gene DN $\alpha$  e un gene DO $\beta$  i cui prodotti sono ancora sconosciuti.



### 3.1.6 Regione HLA

È stato dimostrato che il complesso dei loci HLA A, B, C, DP, DR e DQ è situato sul braccio corto del cromosoma 6. La maggioranza dei dati concernenti i geni di classe I e II è tratta dallo studio sierologico o genomico di famiglie.

Informazioni interessanti sono state ottenute anche da studi dimostranti l'associazione di alcuni fattori del sistema complementare<sup>[9]</sup>, talvolta chiamati antigeni di classe III, con antigeni HLA.

I polimorfismi del fattore B (Bf), C2 e C4 sono legati a quelli degli antigeni HLA (si situano attualmente i locus C2 e C4 a destra del locus HLA-DR).

Il clonaggio di determinati segmenti della regione HLA ha permesso di mettere in evidenza due geni codificanti per le 21-idrossilasi nei pressi del locus C4, geni codificanti per il TNFa, e altri geni la cui funzione non è ancora conosciuta.

Altri marcatori, senza legame apparente con il sistema immunitario, si sono rivelati preziosi per la loro vicinanza alla regione HLA.

È il caso della gliossilasi eritrocitaria (Glo) e del terzo enzima della fosfoglucomutasi (PGM3).

La frequenza di ricombinazioni fra ciascun locus HLA ha permesso di calcolare la distanza fra i geni.

---

<sup>9</sup> **Complemento:** complesso sistema enzimatico costituito da proteine plasmatiche capaci di intervenire in numerosi sistemi antigene-anticorpo e che hanno un ruolo essenziale nei meccanismi effettori dell'immunità. Il Complemento comprende 9 fattori, numerati rispettivamente da C1 a C9. La sequenza reale d'intervento di questi diversi fattori non segue tuttavia la numerazione.

## CAPITOLO 4

### **GENOMICA INTEGRATA – RISULTATI DELLE ULTIME RICERCHE**

#### **4.1 Convergenza della SA con percorsi di malattie autoimmuni (MA)**

La SA è un artrite infiammatoria complessa altamente ereditabile. Anche se sono stati identificati diversi loci non-HLA associati al rischio, catturare il contributo genetico inspiegabile alla patogenesi dell'SA rimane una sfida attribuita ad interazioni additive, pleiotropiche e epistatiche a livello molecolare.

Questa ricerca è stata effettuata in Canada e pubblicata nel 2015 [212].

In questa ricerca, sono stati sviluppati molteplici approcci genomici integrati per quantificare la convergenza molecolare dei loci non-HLA loci con malattie autoimmuni.

E' stato dimostrato che i geni non HLA sono notevolmente sensibili all'accumulo di mutazioni deleterie nella popolazione generale rispetto ai geni tolleranti.

L'analisi proteomica dello sviluppo umano (dalla fase prenatale alla fase adulta) ha rivelato che le proteine codificate da loci non-HLA associati a rischio di SA sono 2 volte più espresse in cellule ematopoietiche adulte.

Le analisi di arricchimento hanno rivelato che i geni associati a rischio di SA si sovrappongono con un numero significativo di vie relative all'immunità ( $p < 0.0001$  a  $9.8 \times 10^{-12}$ ). Le analisi delle interazioni proteina-proteina hanno rivelato che i geni associati a rischio di SA non condivisi (empiriche;  $p < 0.01$  a  $1.6 \times 10^{-4}$ ) sono semi raggruppati che convergono significativamente.

Sono anche state fornite prove iniziali per il coinvolgimento di STAT2/3 nella patogenesi di SA.

Tutti insieme, questi risultati evidenziano la comprensione molecolare su loci non-HLA SA associati a rischio che non sono collegati esclusivamente con sovrapposizione a malattie autoimmuni; piuttosto una componente di percorsi fisiopatologici in comune con altre malattie autoimmuni. Queste informazioni saranno fondamentale per spiegare pienamente la patogenesi di SA ed identificare nuovi “target” terapeutici.

La spondilite anchilosante (SA) è una malattia multifattoriale altamente ereditaria; tuttavia, le alterazioni fisiopatologiche e strutturali rimangono in gran parte indefinite [47].

La genetica della SA suggeriscono che gli alleli *HLA-B27* rappresentano il rischio più alto. Però, anche se oltre l'80% dei casi sono positivi all'allele *HLA-B27*, solo una minoranza (circa l'8%) dei portatori di *HLA-B27* in realtà sviluppano l'SA [48-52].

L'identificazione di loci di rischio attraverso studi di associazione genome-wide (GWAS) in SA ha rivelato ~ 30 loci non-HLA.

Sebbene, sia stato segnalato che alcuni geni sono associati con manifestazioni extra-articolari di SA (ad esempio malattia di Crohn e colite ulcerativa), un gran numero di geni ha mostrato un'associazione SA-specifica.

Collettivamente, questi loci spiegano solo una frazione del fattore genetico dell'SA [50, 51].

Chiarire questa ereditabilità mancante contribuirà a definire meglio l'intero spettro dei fattori di rischio per l'SA [51-54].

Ciò richiede indagini di approcci alternativi, oltre la variazione del livello di sequenza di DNA.

Catturare loci che sono altamente interconnessi con la patogenesi

dell'SA attraverso le interazioni delle proteine, l'epistasi o altri meccanismi regolatori rappresenta un approccio che promette risultati. I loci di rischio con effetto di piccole dimensioni per le malattie autoimmuni ci presentano una grande sfida per spiegare il fattore genetico [53, 55].

Lo Studio di associazione Genome-Wide (GWAS) investiga solo un tipo di variante e non ha la forza e la portata di rilevare altri loci associati a rischio diretto o indiretto che sono regolati in maniera differenziale a livello di mRNA e di proteine.

Recentemente, nuovi approcci vengono applicati nel campo della neuropsichiatria per identificare associazioni indirette attraverso l'effetto di una variante a livello di mRNA e di proteine attraverso le reti di interazione e le analisi di arricchimento [56-59].

Alcuni tentativi precedenti sono stati realizzati con le malattie autoimmuni per rilevare vie rilevanti della malattia e per catturare i loci associati a rischio attraverso l'interconnessione di geni valutata mediante le interazioni proteina-proteina [55, 60-63].

È importante sottolineare che questi studi hanno fornito informazioni o da un set di dati di singolo interattoma<sup>[10]</sup> con un numero limitato di interazioni [61] o hanno studiato un numero limitato di geni associati a rischio di malattie autoimmuni<sup>[11]</sup> [60, 63].

In questo studio, per i loci non-HLA associati a rischio di malattia autoimmune, l'obiettivo è quello di dimostrare l'apparente patterning analogo delle vie e delle reti molecolari sottostanti attraverso l'uso di insiemi di dati di grandi dimensioni.

---

<sup>10</sup> In Biologia molecolare, un **interattoma** è l'insieme complessivo delle interazioni molecolari in una particolare cellula.

<sup>11</sup> d'ora in avanti chiamati semplicemente: **geni di rischio MA**

Sono stati impiegati diversi approcci genomici completi ed integrati composti da più set di dati indipendenti (come, scala di popolazione RNA-Seq, profilo di espressione concernente con lo sviluppo della proteina umana, co-espressione interattoma di reti di grandi proteine e percorso di arricchimento) per catturare meglio la convergenza di loci non-HLA associati al rischio di SA.

Questo studio ha rivelato che geni non-HLA di rischio MA sono sensibili all'accumulo di mutazioni deleterie; che tali geni hanno una maggiore espressione della proteina in cellule ematopoietiche utilizzando i dati di spettrometria di massa per l'espressione proteica; che la “pathway-analisi”<sup>[12]</sup> ha mostrato un significativo arricchimento del percorso condiviso di questi geni; e che l'analisi della rete dell'interazione proteina-proteina (PPI) ha mostrato questi geni non-HLA di rischio MA sono altamente interconnessi a reti geniche funzionali. Si è anche fornito prove a sostegno di nuovi geni regolatori candidati che sono altamente interconnessi con i loci associati a rischio di SA e possono contribuire alla patogenesi della malattia.

## **4.2 Risultati**

### **4.2.1 Sovrapposizione di geni associati a rischio di SA**

Le analisi sono state effettuate su 407 geni da nove malattie

---

<sup>12</sup> L'interrogazione delle banche dati può avvenire un gene per volta oppure sfruttando le potenzialità di software appositamente creati per abilitare la sottomissione delle liste complete dei geni differenzialmente espressi. Nel primo caso si parla di “single-gene analysis”, mentre nel secondo di “pathway analysis” o “enrichment analysis”.

Quest'ultimo approccio all'interpretazione dei dati è sicuramente più potente del primo, dal momento che l'ultima fase dell'analisi dei dati di espressione cerca di ricostruire il fitto scambio di informazioni fra geni.

autoimmuni (SA, malattia di Crohn (CD), psoriasi (PS), colite ulcerosa (UC), malattia celiaca (CED), sclerosi multipla (SM), cirrosi biliare primaria (PBC) , artrite reumatoide (RA) e diabete di tipo 1 (T1D)); (Fig 1; Tabella 1). I geni associati a rischio di SA si sono altamente sovrapposti con CD (11 geni) e UC (8 geni); (Fig. 2).

È stata osservata anche una sovrapposizione moderata con CED (5 geni), e psoriasi (PS) (5 geni), mentre è stata osservata una sovrapposizione minima tra SA e T1D (4 geni), MS (4 geni), e PBC (1 gene).

C'erano otto geni unici di SA, 17 geni che si sono sovrapposti con al massimo due malattie autoimmuni, e cinque geni che si sono sovrapposti con più di due malattie immunitarie (Figura 2).

#### **4.2.2 Misura di selezione purificante per geni associati a rischio autoimmune**

Essenzialmente, il concetto di selezione purificatrice può essere quantificato conducendo analisi al livello del carico esone di mutazioni deleterie per un gene [56].

Sono state curate serie di geni che hanno mutazioni a perdita di funzione (LOF) nella popolazione generale e non producono alcun fenotipo osservabile [64].

L'analisi per quantificare la selezione purificante di set di geni per ogni fenotipo confrontando set di geni tollerati ha rivelato che i geni di rischio MA erano sotto significativa pressione di selezione purificante, ad eccezione di geni UC-associati. CeD e T1D hanno manifestato la deviazione più significativa,  $p < 2.18 \times 10^{-6}$  e  $p < 1,24 \times 10^{-6}$ , rispettivamente.

Anche tutti gli altri geni di rischio MA hanno manifestato un modello simile di accumulo di variazione di “mutazione di senso” (missense<sup>[13]</sup>) che era deviato rispetto ai geni LOF tollerati.

Fenotipicamente, è stato dimostrato che questi geni tollerano LOF e possono avere un eccessivo onere mutazionale senza alcun impatto fenotipico spiacevole. Al contrario, la deviazione più significativa è stata osservata nei geni associati al disturbo dello spettro autistico (ASD) ed al ritardo mentale (ID) che erano molto sensibili alle varianti deleterie (Figura 2).

#### 4.2.3 Abbondanza della trascrizione di geni associati a rischio MA

Per quantificare le trascrizioni differenzialmente espresse per ogni malattia autoimmune, il frammento per kilobase mappata (FPKM) è stato calcolato per ogni malattia usando il genoma come sfondo.

Le trascrizioni che erano altamente espresse (cioè, sopra il 75% del genoma) hanno rivelato un numero maggiore di abbondanza di trascrizione per geni di rischio MA rispetto al genoma di background.

PS, PBC e RA hanno manifestato un numero eccessivo di trascritti genici altamente espressi rispetto ad altri geni della malattia (Figura 3A). SA, CD e T1D hanno manifestato abbondanza di trascritti altamente espressi vicino alla media del genoma con CeD che ha manifestato la più bassa abbondanza di trascritti.

---

<sup>13</sup> Sostituzione di una singola base del DNA che causa la comparsa di una tripletta che codifica un aminoacido diverso da quello codificato dalla tripletta originale. Mutazione di sfasamento del registro di lettura (frameshift). Mutazione costituita dalla delezione (*tipo di aberrazione cromosomica o mutazione cromosomica, che consiste nell'assenza di un tratto di un cromosoma, con conseguente perdita di materiale genetico*) o inserzione di un numero di coppie di basi (bp) che non è un multiplo di 3, che altera quindi il registro con cui vengono letti i codoni di un gene.



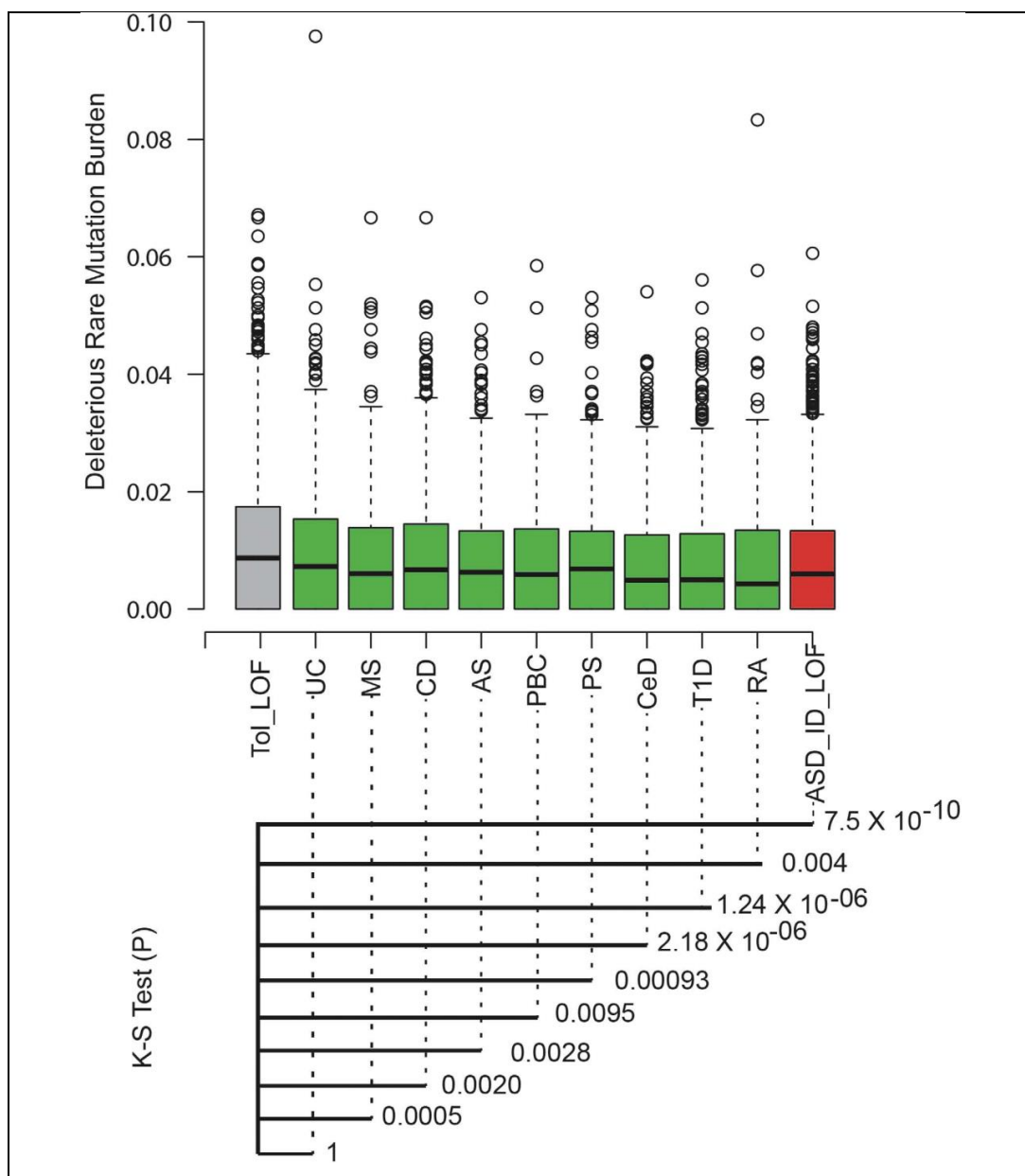
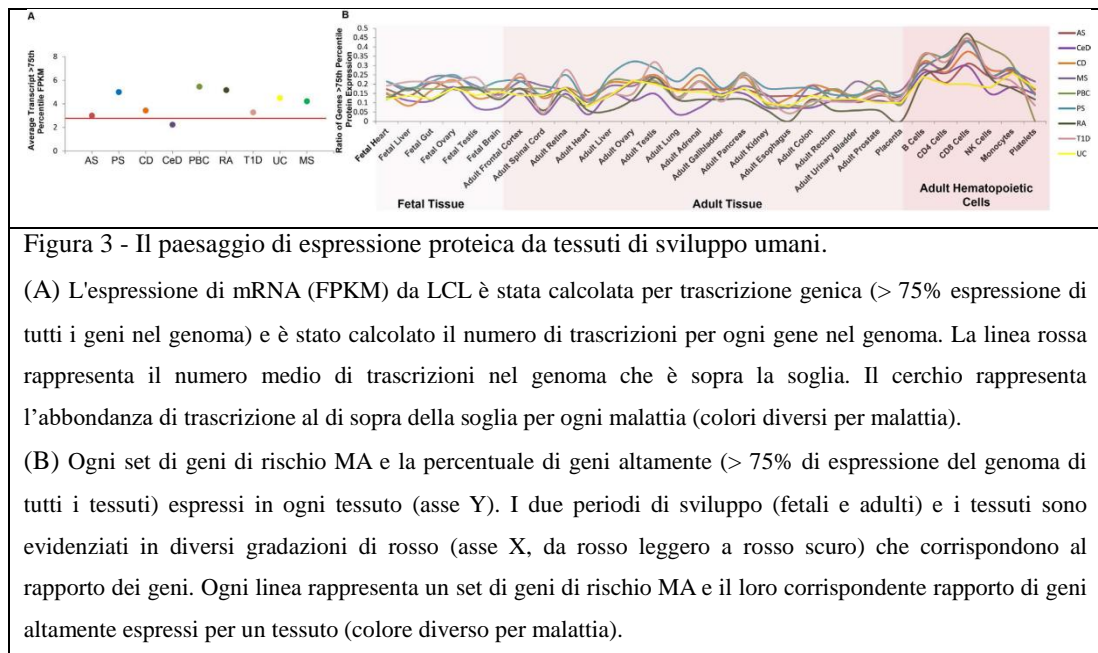


Figura 2. - Il peso del recente accumulo di mutazioni deleterie.

Il peso delle mutazioni deleterie (“missense” rare e LOF) per ogni esone (normalizzato per lunghezza di esone) è stato calcolato in funzione del fenotipo (rosso e verde) e non-fenotipo set di geni tollerati (grigio). La “trama baffo” (whisker plot) mostra ogni barra con quartili minimi e massimi. La barra grigia rappresenta l'accumulo di deleterie rare mutazioni LOF di esoni entro geni che sono tollerati negli esseri umani per le mutazioni LOF. La barra verde rappresenta la malattia autoimmune e la barra rossa rappresenta geni segnalati per avere mutazioni LOF deleterie in disturbi dello spettro autistico (ASD). La significatività dell’(test p-value K-S) dell’accumulo di rare mutazioni deleterie per un fenotipo è stata ottenuta confrontando la distribuzione del peso tra geni tollerati e geni fenotipici.



#### 4.2.4 Espressione proteica

L'espressione proteica è stata analizzata per i geni di rischio MA utilizzando 29 campioni istologicamente normali in due periodi di sviluppo (ad esempio, feto e adulto). L'espressione complessiva media per ogni gene di rischio MA ha rivelato prove di tessuto di origine (Figura 4). Fatta eccezione per T1D, l'espressione complessiva è stata maggiore nelle cellule ematopoietiche rispetto ad altri tessuti in tutti i gruppi di malattie. L'espressione media nei tessuti ha indicato che i geni erano altamente espressi in retina adulta (12.48 spettri medi per gene) rispetto ad altri organelli (Figura 4).

Allo stesso modo, oltre alle cellule ematopoietiche, maggiore espressione proteica è stata rilevata nel colon e nella cistifellea in CeD, nel pancreas in T1D e PBC, nella retina in MS e PS, e nella corteccia frontale in CD e UC. I geni associati con RA hanno manifestato l'espressione proteica più scarsa.

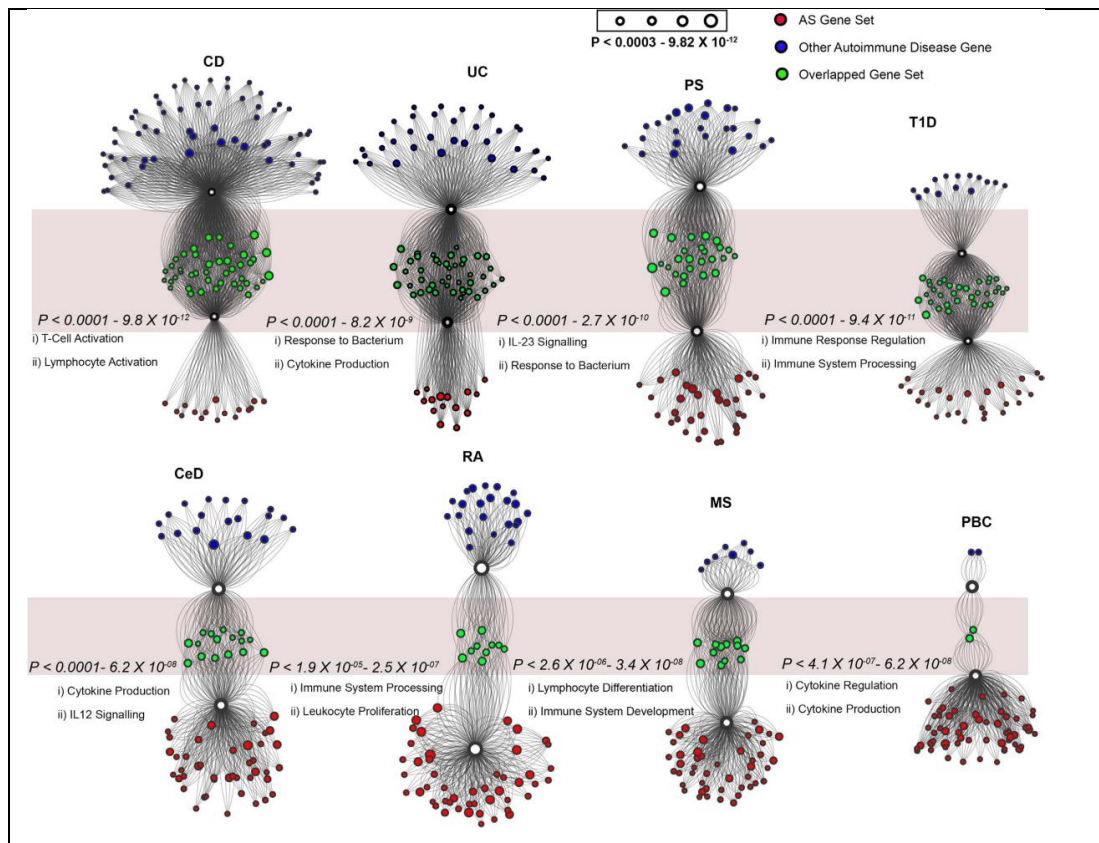


Figura 4 - Percorso arricchimento di sovrapposizione SA-geni.

L'analisi di arricchimento dei percorsi attraverso "gene set association" è stata condotta per ogni set di geni. Ogni nodo all'interno della rete rappresenta un set significativo di geni appartenente ad un percorso. Il numero di bordi di un nodo di percorsi (pathway node) corrisponde al numero di geni di rischio sovrapposti con quel particolare set di geni-percorso (pathway gene set). La dimensione del nodo corrisponde al p-value. I nodi verdi tracciati rappresentano i percorsi significativi di sovrapposizione tra SA (nodo rosso) e di altre malattie autoimmuni (nodo blu). Il range di p-value per le vie di sovrapposizione è indicato accanto a ogni gruppo di malattie. I più significativi primi due percorsi che si sovrappongono con i geni di rischio SA sono visualizzati sotto il p-value.

L'analisi è stata successivamente eseguita per determinare la percentuale di geni di rischio MA che sono altamente espressi (sopra il 75% dell'intero genoma) per ciascun tessuto (Figura 3B). Il rapporto di proteine altamente espresse ha rivelato che questi geni erano almeno 2 volte più espressi nelle cellule ematopoietiche adulte, specificamente nelle cellule B, cellule CD4 e cellule CD8 rispetto ad altri tessuti.

#### 4.2.5 Analisi dei percorsi di arricchimento

Un'analisi completa del gene è stato eseguita per ottenere vie di geni significativamente arricchite utilizzando il test esatto di Fisher (FET). Dopo molteplici correzioni e utilizzando un rigoroso cut-off (vedi metodo) per ogni fenotipo, sono stati ottenuti gli insiemi di geni significativi, che appartengono a vie specifiche.

I primi due percorsi significativi per SA includevano la produzione di citochine (corretto;  $p < 5,10 \times 10^{-5}$ ) e la risposta al batterio (corretto;  $p < 2,24 \times 10^{-5}$ ).

Le vie più significative (dopo il test di correzione multipla) per tutte le altre malattie autoimmuni erano: attivazione delle cellule T ( $p < 1,66 \times 10^{-8}$ ) per CD, NKT ( $p < 6,54 \times 10^{-6}$ ) per CeD, differenziazione dei linfociti ( $p < 2,92 \times 10^{-4}$ ) per MS, eventi di segnalazione IL-23-mediati ( $p < 2,57 \times 10^{-7}$ ) per PS, regolazione dell'attivazione linfocitaria ( $p < 0,0005$ ) per RA, regolazione della risposta immunitaria ( $p < 7,28 \times 10^{-7}$ ) per T1D, risposta a molecola di origine batterica ( $p < 2,3 \times 10^{-6}$ ) per UC e peptidil-fosforilazione della tirosina ( $p < 0,009$ ) per PBC.

Per identificare le sovrapposizioni, le vie arricchite di tutti le otto malattie autoimmuni sono state confrontate con vie significative per i geni associati a rischio di SA.

Sorprendentemente, sono state identificate vie più sovrapposte di almeno 2 volte (significative in entrambi i fenotipi) tra SA e CD, UC, PS, CeD e T1D rispetto alle altri quattro MA (Figura 4).

#### 4.2.6 Rete di interazione proteina-proteina

Dal momento che i geni associati a rischio condivisi confonderanno le interazioni e produrranno bias di associazione, sono stati usati solo i geni associati a rischio di SA. Questo rivelerà l'interazione di loci associati a rischio a livello molecolare che hanno un'associazione indipendente a livello del DNA.

Usando questo approccio, la rete PPI costruita ha rivelato in modo significativo (50.000 permutazioni;  $p$  empirico  $< 1,6 \times 10^{-4}$ , Bonferroni corretto) connettività modulare densa per i geni SA con altri sette geni associati a rischio di malattia autoimmune (ad esempio, CD, PS, UC, CeD, MS, RA, e PBC).

Il maggior numero di interazioni è stato osservato tra i geni associati a rischio di SA e CD, PS e UC per i geni associati a rischio non condivisi (Figura 5).

Per catturare nuovi geni candidati, abbiamo ipotizzato che altri geni associati a rischio di malattie autoimmuni che sono altamente interconnessi con i geni associati a rischio di SA (non condivisi) vengono regolati in modo differenziale in casi di SA rispetto ai controlli.

Uno studio proof-of-concept<sup>14</sup> è stato avviato per verificare questa ipotesi. Sono stati scelti in modo casuale due geni associati ad SA, *IL23R* e *NOS2*, e la variazione dell'espressione di mRNA è stato misurata tra i membri della famiglia affetti e non affetti.

---

<sup>14</sup> Con la locuzione inglese Proof of Concept (PoC), che si può tradurre in italiano con prova del concetto, si intende un'incompleta realizzazione o abbozzo (sinopsi) di un certo progetto o metodo, con lo scopo di dimostrarne la fattibilità o la fondatezza di alcuni principi o concetti costituenti.

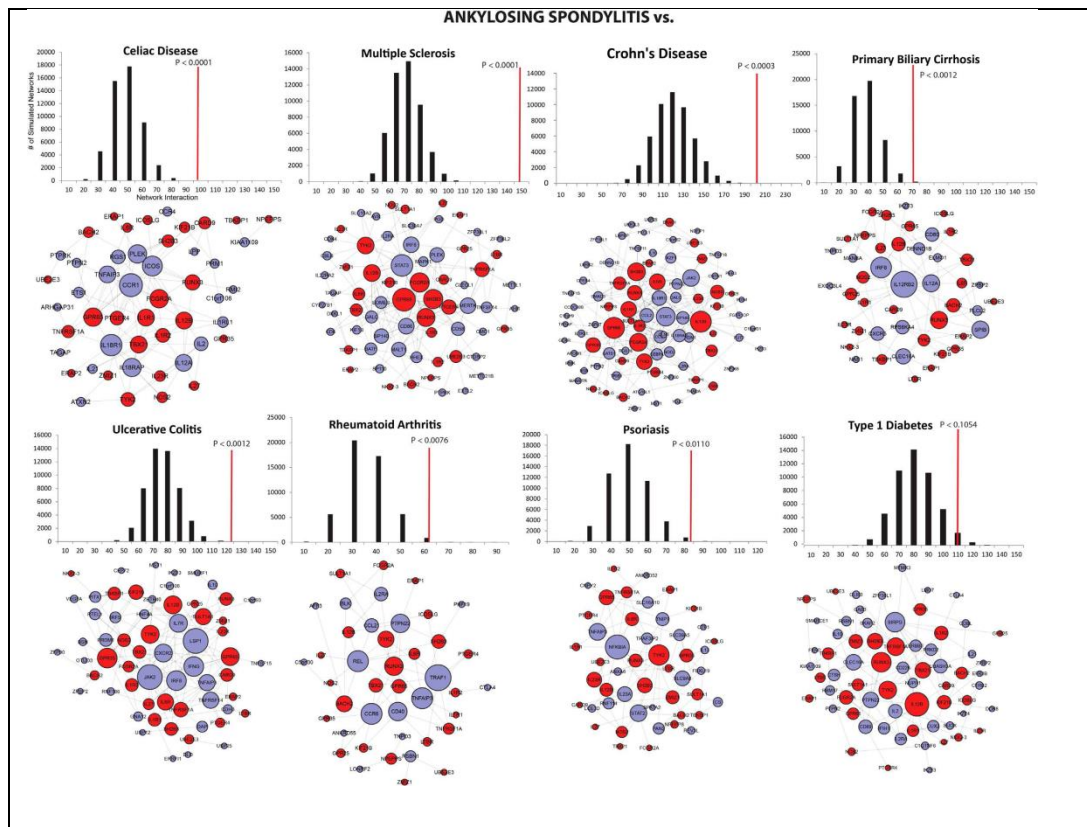


Figura 5 - Reti gene associate a malattie immunitarie mediate.

Ogni nodo rappresenta un gene rischio corrispondente ad SA (nodo rosso) o di una malattia mediata immunitaria (blu nodo). Il bordo tra i nodi rappresenta interazioni. dimensioni nodo è rappresentato dal numero di spigoli. La trama superiore visualizza il test di permutazione. Per ogni set di gene autoimmune, un uguale numero di geni sono stati selezionati in modo casuale 50.000 volte. La distribuzione nulla della connettività tra il set casuale il gene SA è “plottata” come un istogramma e la linea rossa rappresenta l'osservazione originale. Il p-value empirico è stato calcolato dal test di permutazione.

L'analisi dell'espressione ha rivelato che questi geni altamente interconnesso associati ad SA (cioè, *IL23R* e *NOS2*) avevano espressione di mRNA costantemente ridotta in individui affetti rispetto agli individui non affetti da SA, con la riduzione dell'espressione di mRNA di *NOS2* che ha raggiunto la significatività ( $p < 0,01$ ).

Per capire meglio i percorsi condivisi e per identificare i geni eziologici, ogni gene non associato ad SA è stato classificato in base alla connettività fornita della rete dedotta con i geni associati ad SA.

I primi due geni non-SA che hanno mostrato maggiore connettività

sono stati *STAT3* e *IL12RB2*.

*IL12RB2* ha manifestato ridotta espressione di mRNA in casi SA, ma non è riuscito a raggiungere la significatività ( $p < 0.15$ ).

In contrasto, l'espressione di mRNA di *STAT3* ha manifestato una riduzione significativa ( $p < 0.01$ ) nell'espressione di mRNA in casi SA rispetto ai controlli.

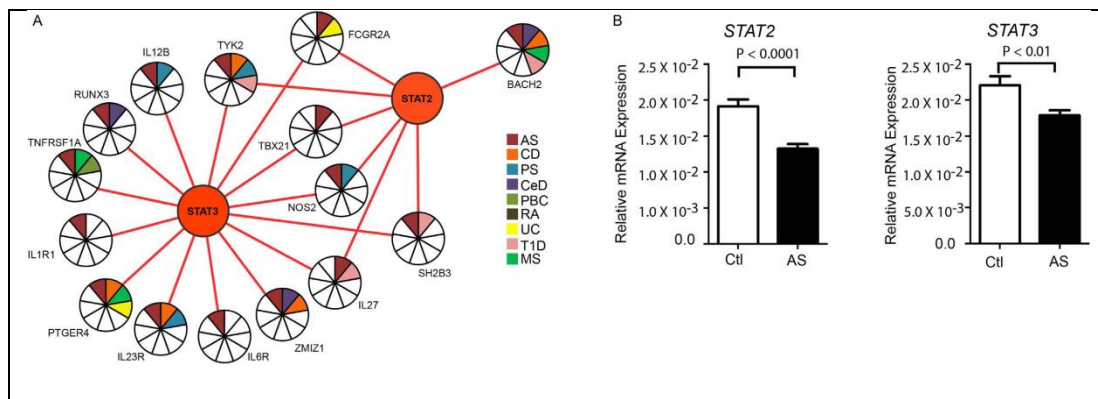


Figura 6 - Associazione di STAT2 e STAT3 con SA.

(A) di rete Interazione di STAT2 e gene STAT3 con altri geni di rischio non HLA identificate in nove immunitario malattie mediate. livelli di espressione

(B) Gene di STAT3 e STAT2 in AS casi e controlli. Un'analisi qPCR di linee di cellule B derivati da pazienti ha mostrato la relativa espressione di STAT3 stat2 e geni in tutto il colpita (barra bianca) e individui non affetti (bar nero).

Gli individui sono anche raggruppati in base alla loro diagnosi clinica per confrontare l'espressione, normalizzato solo GAPDH. La trama barra rappresenta il livello di espressione di mRNA (asse Y) e il limite superiore e inferiore rappresentato da media  $\pm$  SEM. A t-test ha confermato differenze significative ( $p < 0,05$ ) tra i gruppi per entrambi i geni.

Anche un altro gene appartenente alla famiglia *STAT*, *STAT2*, si è classificato tra i primi 10 geni. L'espressione relativa di mRNA per *STAT2* era significativamente ( $p < 0,0001$ ) ridotta in casi SA rispetto ai controlli.

È interessante notare che, sia *STAT2* che *STAT3* hanno manifestato una maggiore connettività con almeno altre cinque reti di interazione di malattie autoimmuni (Figura 6A).



Gli esperimenti di Western Blot sono stati effettuati per quantificare l'espressione proteica di *STAT2* e *STAT3* da individui clinicamente diagnosticati con e senza SA (Fig. 5B).

Simile all'espressione di mRNA, anche l'espressione proteica ha rivelato espressione costantemente bassa in individui affetti rispetto agli individui sani (Figura 6).

### 4.3 **Discussione**

Questo è il primo rapporto che dimostra come un approccio di genomica integrata può essere utilizzato per dedurre reti complesse, percorsi e geni candidati alla base di un grande insieme di malattie autoimmuni.

Siccome i geni SA spiegano solo una frazione del totale fattore di rischio [53-54], è indispensabile cercare soluzioni alternative, oltre la variazione di sequenza di DNA per chiarire questa ereditabilità mancante.

I geni associati con le caratteristiche extra-articolari di SA [49,65-67] possono rappresentare vie condivise della malattia (ad esempio co-segregazione di CD e UC all'interno delle famiglie SA [67]).

La natura pleiotropica di alcuni geni (condivisi) all'interno di più malattie del sistema immunitario può essere catturata attraverso studi GWAS (vale a dire, *GPR65*, *IL23R*, *RUNX3*) [51], mentre, le interconnessioni cellulari di geni HLA non condivisi non sono chiare. Una convergenza statisticamente significativa è stata dimostrata attraverso la sovrapposizione di analisi di arricchimento delle vie o di analisi della rete di co-espressione delle proteine con altre malattie



autoimmuni (T1D e PS), che in minima parte condividono geni associati a rischio.

Questi risultati suggeriscono che i geni comprendono un percorso più ampio di immunità ed evidenziano l'importanza di indagare geni associati a rischio non condivisi da altre malattie del sistema immunitario per individuare un'associazione a livello proteico o di mRNA.

La rete PPI costruita per rivelare l'interazione di loci associati a rischio a livello molecolare ha dimostrato connettività modulare significativamente densa per i geni SA con altri sette geni di rischio MA, e che la successiva analisi dell'espressione ha rivelato che due dei geni SA altamente interconnessi (cioè, *IL23R* e *NOS2*) hanno ridotto costantemente l'espressione di mRNA in individui affetti rispetto agli individui non affetti, ha confermato la nostra ipotesi che altri geni associati a rischio di malattie autoimmuni che sono altamente interconnessi con geni (non condivisi) associati a rischio di SA sono differenzialmente regolati in casi SA rispetto ai controlli, e ha fornito le basi per ampliare l'analisi per identificare potenziali nuovi geni candidati per SA.

L'analisi delle mutazioni deleterie suggerisce che tutti i set di geni associati a rischio immunitario sotto selezione purificante sono comparabili con i geni tollerate nella popolazione normale.

Il rapporto di proteine altamente espresse ha rivelato che i geni erano almeno 2 volte più espressi in cellule ematopoietiche adulte, specificamente in cellule B, CD4 e CD8 rispetto ad altri tessuti. Questo è coerente con l'analisi LCL di abbondanza di trascritti, ed è la prova della regolazione differenziale di questi geni nelle cellule

ematopoietiche adulte.

Questa scoperta supporta anche la natura ad insorgenza adulta della maggior parte delle malattie autoimmuni.

Queste informazioni possono svolgere un ruolo fondamentale per la futura ricerca sui modelli dei meccanismi delle malattie del sistema immunitario e sperimentazioni di farmaci [68-71].

Questo studio fornisce una forte evidenza degli effetti pleiotropici dei singoli geni e l'importanza della differenziazione Th-17 nella patologia delle malattie immunitarie.

Il fatto che primi dieci geni non-SA che mostravano la maggiore connettività dopo che ogni gene non-SA è stato classificato in base alla connettività fornita dalla rete dedotta con i geni SA erano *STAT2*, *STAT3* e *IL12RB2*, che l'mRNA e l'espressione proteica di *STAT2* e *STAT3* era significativamente ridotta in casi SA rispetto ai controlli, e che sia *STAT2* che *STAT3* hanno manifestato una maggiore connettività con almeno altre cinque reti di interazione di malattie autoimmuni, suggerisce un ruolo critico della via di segnalazione Th-17 nella patogenesi di SA.

Questo risultato è coerente con i geni coinvolti nella differenziazione di Th-17 (25) e la segnalazione di IL-23 raggiungendo un livello di significatività genoma-wide in altre malattie immunitarie correlate [72,73], il ruolo di primo piano del percorso di segnalazione Th-17 nella patogenesi delle relative malattie immunitarie (28-31), e supporta un precedente rapporto, che associava *STAT3* con SA [49], e un recente rapporto che le mutazioni *de novo* in *STAT3* sono state segnalate in malattie autoimmuni ad esordio precoce [78].

In sintesi, una vasta e completa analisi basata sui geni è stata sviluppata ed eseguita per catturare la natura pleotropica di geni associati a malattie autoimmuni. Sono stati impiegati approcci sistematici multipli, che hanno rivelato da diverse linee di evidenza, che i geni associati a rischio di SA sono infatti biologicamente raggruppati con altri geni associati a rischio di malattie autoimmuni e che convergono all'interno di percorsi di immunità comuni.

L'analisi ha rivelato che:

- 1) i geni associati a rischio di malattie autoimmuni (anche i geni SA) sono sotto selezione purificante significativa (vale a dire, minore accumulo di varianti esoniche deleterie) rispetto ai geni non fenotipici;
- 2) i geni associati a rischio indagati sono prevalentemente espressi (proteina) all'interno delle cellule ematopoietiche adulte;
- 3) i geni associati a rischio di SA condividono vie comuni con altri geni associati a rischio di malattie autoimmuni (ad esempio, CD, UC, PS e T1D);
- 4) le reti di interazione ottenute da geni SA erano modulari in modo significativo con i geni associati a rischio implicati in condizioni immunitarie a livello globale rispetto a qualsiasi insieme casuale di geni;
- 5) la famiglia di geni *STAT* e la via di segnalazione Th-17 sono implicati nella patogenesi dell'SA. I nostri risultati hanno diverse implicazioni importanti per l'interpretazione dei geni identificati attraverso GWAS, in particolare per quanto riguarda i geni non condivisi ed altamente collegati.

## 4.4 Metodi

### 4.4.1 Recenti mutazioni deleterie in geni associati a rischio del sistema immunitario (SI)

Un'analisi estesa è stata effettuata utilizzando 407 geni GWAS associati a rischio significativo per le nove malattie immunitarie (SA, CD, PS, UC, Ced, MS, PBC, RA e T1D) per valutare quantitativamente il carico di mutazioni deleterie al livello dell'esone come misura di selezione purificante.

Ciò è stato realizzato analizzando il verificarsi di rare mutazioni missense e mutazioni a perdita di funzione (OL) per ogni esone da varianti del server exome (ESV) composto da 4.300 americani di origine europea (EA) [79].

E' stato preso in considerazione un modello esone composto per calcolare le mutazioni rare missenso e LOF per ciascuno dei geni associati a rischio MA.

### 4.4.2 Carico di recenti mutazioni deleterie in geni associati a rischio del sistema immunitario

Per i geni dell'intero genoma, il verificarsi di mutazioni rare "missense" e LOF annotate nel Genome Analysis Toolkit (GATK) è stato calcolato sulla base di annotazioni dell'esone RefSeq e normalizzato per la lunghezza dell'esone.

Il modello utilizzato è stato quello in cui gli esoni che si sovrapponevano da più isoforme sono stati fusi in un unico punto di interruzione.

Per una serie di riferimento, 98 geni, per i quali era stato precedentemente dimostrato di tollerare mutazioni LOF, sono stati

curati con ogni gene che ospitava almeno una LOF in un gruppo di controllo [64].

Dato che le mutazioni LOF situate in detti geni non riescono a produrre un fenotipo osservabile, i geni sono stati trattati come controllo con il presupposto che l'avere rare mutazioni “missense” non manifesterebbe un fenotipo. Al contrario, i geni associati a rischio per le nove malattie autoimmuni sono stati considerati sensibili alle mutazioni “missense” rare.

Inoltre abbiamo curato 87 geni con mutazioni LOF identificate in autismo e nel ritardo mentale da sette studi dell'esoma/sequenziamento del genoma pubblicati [46, 47, 80-84].

Questi geni particolari sono stati assunti per rappresentare rare mutazioni ultrasensibili e di conseguenza devono essere soppressi dall'accumulo di mutazioni “missense” rare. Per testare l'effetto delle mutazioni “missense” rare, un test di Kolmogorov-Smirnov (KS) è stato eseguito tra il carico delle mutazioni “missense” rare tra i geni LOF tollerati e le altri nove malattie autoimmuni.

#### **4.4.3 Abbondanza di trascritti di geni associati a rischio di malattie autoimmuni**

Abbiamo ottenuto il frammento dell'espressione pre-calcolato per kilobase mappata (FPKM) per ogni trascritto (da RNA-Seq) del genoma da linee cellulari linfoblastoidi (LCL) derivati da 45 individui che compongono Human Genome Diversity Panel (HGDP) [39].

Un totale di 216,636 trascritti rilevati da LCL sono stati annotati nei database RefSeq, Ensembl, UCSC, o Gencode. Il FPKM per trascritto è stato calcolato usando gemelli 2.2.0 e normalizzati [85].

Per catturare l'abbondanza di trascritti altamente espressi, è stato calcolato il numero medio di trascritti nel genoma che erano espressi al di sopra del 75% della popolazione.

Allo stesso modo, il numero medio di trascritti che sono stati espressi al di sopra del 75% è stato calcolato per ogni set di geni associati a rischio di malattie autoimmuni.

#### **4.4.4 Espressione proteica nello sviluppo umano**

Il livello di espressione della proteina per i geni associati a rischio di malattie autoimmuni mediate è stato analizzato usando la spettrometria di massa genome-wide Fourier-transform ad alta risoluzione (scaricata da Human Proteome Map) da sei tessuti fetali umani (per esempio, cuore, fegato, intestino, ovaie, testicoli, e cervello), 18 tessuti adulti (vale a dire, corteccia frontale, midollo spinale, retina, cuore, fegato, ovaio, testicolo, polmone, surrene, cistifellea, pancreas, reni, esofago, colon, retto, vescica, prostata, e placenta) e sei cellule ematopoietiche primarie purificate (cioè, B, CD4, CD8, NK, monociti e piastrine) da campioni istologicamente normale [86]. I dati hanno portato alla identificazione di proteine codificate da 17.294 geni che rappresentano circa il 84% del totale dei geni codificanti proteine nell'uomo [86].

E' stata calcolata l'espressione media della proteina (cioè, la media di conteggi spettrali per gene per campione) di tutti i geni nel genoma per ogni tipo di tessuto. Per identificare i tessuti altamente espressi (25%) per ciascuna malattia, è stato calcolato il rapporto di geni per ciascun tessuto dove i geni erano espressi sopra il 75% dell'intero set di dati genoma.

#### 4.4.5 Analisi di arricchimento del gene

I set di geni sono stati ottenuti da gene ontology (GO) curato manualmente (pacchetto R, versione 2.8.0), via dal National Cancer Institute presso il National Institutes of Health (NIH, il 30 maggio scorso -2013), Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG, il 30 maggio scorso -2013), e Reactome (3 giugno -2013).

Spesso, i grandi insiemi di geni rappresentano grandi categorie con poco significato biologico (ad esempio, la regolamentazione di un processo fisiologico, vincolante lo ione dello zinco).

Al contrario, è improbabile che piccoli insiemi di geni producano risultati statisticamente significativi. Di conseguenza, l'analisi è stata limitata ai termini annotati con 15 a 1.000 geni (media = 180) da GO, NCI, KEGG e Reactome, ottenendo 2.729 set di geni da un background di 23.510 geni.

Per identificare vie biologicamente significative, abbiamo cercato per vie in cui i geni associati a rischio erano sovrarappresentati per otto malattie autoimmuni.

Per quantificare la portata di una data, è stato eseguito il test esatto di Fisher (FET) che valuta l'arricchimento di geni in una via rispetto al background del genoma costituito da 23,510 geni.

Dalla distribuzione nulla del valore  $p$ , è stato calcolato un FDR utilizzando la procedura di Benjamini-Hochberg.

Un insieme di geni è stato considerato essere significativamente arricchito quando FET  $p < 1,0 \times 10^{-3}$  e FDR  $< 0,01$ .

Dopo aver ottenuto gli insiemi di geni significativamente arricchiti da ogni fenotipo, è stata effettuata una valutazione di come molti di questi insiemi di geni si sovrappongono con i set di geni significativi ottenuti da SA.

Rete di interazione proteina-proteina dei geni che non si sovrappongono.

Per studiare le complesse interazioni PPI tra SA e altre malattie del sistema immunitario, sono stati analizzati un totale di 407 geni associati a rischio, da altre nove malattie autoimmuni.

Un metodo basato sulla rete è stato utilizzato per dedurre la connettività tra i geni SA e gli insiemi di geni associati a rischio delle altre otto malattie autoimmuni come determinato da GWAS.

Il fatto che ci fossero delle sovrapposizioni tra i geni SA ed i geni di altre malattie autoimmuni, indica che la rete è stata influenzata dalle sovrapposizioni genetiche condivise.

Di conseguenza, i geni associati a rischio di malattie autoimmuni che si sovrappongono con i geni di SA sono stati esclusi dalle analisi successive.

Il risultato netto rappresenta una rete di interazione vera e propria tra i geni non sovrapposti.

I geni associati a rischio di SA non condivisi sono stati usati come semi e le reti di interazione dedotte sono state confrontate con altri geni associati a rischio di malattie autoimmuni.

Utilizzando GeneMANIA, che rappresenta la più grande risorsa di reti di interazione dei geni per organismi multipli [87], le reti di interazione combinati per gli esseri umani dove la base del set di interazioni comprendeva 6,998,947 interazioni a coppie.



Questo set è stato derivato da PPI fisico, co-espressione o analisi di co-localizzazione.

Sono state escluse le interazioni di coppia di geni simmetrici ed ogni coppia di geni consisteva in un grado di connettività.

#### 4.4.6 Test di permutazione

Un problema inerente con i dati di interazione è che alcuni geni sono ben studiati e in grado di produrre più connessioni rispetto ad altri geni [88, 89].

Per eliminare tali distorsioni, è stato eseguito un test di permutazione esaustivo basato sulla connettività per una coppia di insiemi di geni.

Per ogni coppia di insiemi di geni (A e B), i geni all'interno dell'insieme A erano geni associati a rischio di SA, mentre i geni all'interno dell'insieme B erano geni associati a rischio di formare una delle otto malattie autoimmuni.

La connettività iniziale è stata dedotta sulla base dell'insieme di geni A e B dai dati di interazione.

Un test di permutazione limitato all'insieme B è stato eseguito sostituendo in modo casuale un numero uguale di geni appartenenti all'insieme B (50,000 volte, selezionato casualmente da un background di 22,695 geni di codificanti proteine).

Il valore empirico  $p$  è stato calcolato confrontando la connettività originale con la connettività di geni selezionati in modo casuale utilizzando il test di correzione multipla di Bonferroni.

#### 4.4.7 Analisi Q-PCR e Western Blot

E' stata effettuata una Real-time PCR utilizzando TaqMan Gene di Expression Assay per i seguenti geni:

- ✓ *IL12RB2* (Hs00155486\_m1),
- ✓ *JAK2* (Hs00234567\_m1),
- ✓ *LSP1*(Hs00158886\_m1),
- ✓ *NOS2* (Hs01075529\_m1),
- ✓ *STAT2* (Hs01013123\_m1),
- ✓ *STAT3* (Hs00374280\_m1),
- ✓ *GAPDH* (Hs99999905\_m1)

di Life Technologies (Cat # 4331182).

I campioni sono stati testati secondo le istruzioni del costruttore, utilizzando un Viia 7 (Life Technologies).

I campioni triplici sono stati analizzati utilizzando il metodo del ciclo della soglia comparativa ed i campioni sono stati espressi normalizzati solo per *GAPDH* ( $\Delta CT$ ) o normalizzati sia per *GAPDH* che Proband ( $\Delta\Delta CT$ ).

I risultati sono illustrati come media  $\pm$  SEM e sono state effettuate analisi statistiche utilizzando ANOVA unidirezionale o t-test.

## CAPITOLO 5

### **L'ASSE INTERLEUCHINA (IL) -23 / IL-17 NELLA SA: NUOVI PROGRESSI E POTENZIALITÀ PER IL TRATTAMENTO**

## 5.1 Generalità

La spondilite anchilosante (SA), la forma più comune di spondiloartropatia, è una progressiva malattia infiammatoria cronica che colpisce tipicamente le articolazioni sacro-iliache e lo scheletro assiale. Sebbene gli esatti meccanismi alla base della patogenesi della SA restano da chiarire, la presenza dell'antigene leucocitario umano (HLA) -B27 è noto per aumentare notevolmente il rischio di sviluppo della SA.

Gli attuali trattamenti comprendono farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) e gli antagonisti del fattore di necrosi tumorale (TNF).

Negli ultimi anni, è stato dimostrato che la via l'interleuchina (IL) -23 / IL-17 potrebbe influenzare la patogenesi della SA e le modalità di trattamento che puntano a questo percorso hanno dimostrato essere utili in varie altre condizioni infiammatorie.

Questa ricerca, effettuata nel Regno Unito (UK) e pubblicata nel 2015 [\[213\]](#), fornisce una panoramica del percorso IL-23 / IL-17 nella patogenesi della SA e riassume nuovi potenziali trattamenti per la SA e altre malattie infiammatorie correlate.

## 5.2 SA ed altre malattie infiammatorie autoimmuni

La SA è un comune malattia reumatica infiammatoria, cronica, progressiva caratterizzata da sacroileite e infiammazione assiale. La SA può essere considerata come un disturbo infiammatorio

autoimmune (IMID). Gli IMID comprendono una vasta gamma di malattie, tra cui l'artrite reumatoide (AR), la psoriasi, le malattie infiammatorie intestinali (IBD) la malattia di Crohn e la colite ulcerosa, il diabete mellito di tipo 1 (DM1) e la sclerosi multipla (SM). Tutte gli IMID hanno in comune le caratteristiche azioni dell'infiammazione cronica; alcuni (T1DM, MS, AR) hanno chiare caratteristiche autoimmuni a seguito mancata tolleranza o regolazione immunitaria, mentre altri, come l'IBD e SA, sono più “autoinfiammatorie” [99].

Nel corso degli ultimi tre decenni, i progressi nella ricerca molecolare e immunologica hanno portato ad un aumento della nostra comprensione di queste malattie e hanno più volte messo in evidenza un ruolo chiave della disregolazione delle citochine nella loro fisiopatologia. Anche se queste molecole sono note per essere facilitatori imperativi della normale funzione immunitaria, gli squilibri nei livelli delle citochine possono portare a disturbi infiammatori sia acuti che cronici, questi ultimi sembrano predominanti.

Una spiegazione sul motivo per cui questi disturbi tendono ad essere persistenti rimane da chiarire, ma la predisposizione genetica, le cascate di citochine, i trigger d'avvio duraturi e la mancata risoluzione dell'infiammazione potrebbero probabilmente contribuire all'amplificazione delle risposte immunitarie.

I fattori genetici hanno dimostrato di essere determinanti ai fini della predisposizione ed, è curioso, che un numero significativo di questi pazienti hanno diverse IMID (co-esistenti).

La SA è l'IMID con la maggiore ereditarietà, stimata da studi singoli

maggiore del 90% [115]. Inoltre, recenti meta-analisi di dati di studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) hanno dimostrato che la SA condivide multiple associazioni genetiche con l'IBD e la psoriasi [168].

Il possesso dell'antigene leucocitario umano di classe 1 (HLA) -B27 conferisce circa il 30% del rischio genetico totale di sviluppare AS.

Gli altri più comuni sono i polimorfismi del reticolo endoplasmatico aminopeptidase 1 (ERAP1) (un enzima che rifinisce i peptidi per la presentazione dell'antigene), il recettore interleuchina (IL)-23 (IL-23R) e altri tipi di geni T helper 17 (Th17) / 23 [165].

Più polimorfismi genetici all'interno dei geni Th17 / 23 sono stati trovati in comune tra la SA, l'IBD e la psoriasi, suggerendo un ruolo patogenetico comune.

Più di recente, la ricerca ha dimostrato che anche fattori ambientali aggiuntivi (come il microbiota<sup>15</sup>, le infezioni e l'esposizione a farmaci e tossine) svolgono un ruolo importante nella patogenesi della SA [166].

Parallelamente a questi progressi genetici, studi immunologici hanno insinuato la presenza di risposte Th17 / 23 in SA (e IBD e psoriasi). Più recentemente, strategie terapeutiche che puntavano alla risposta Th17 hanno dimostrato benefici nella SA [167].

Questa recensione riassume la biologia dell'asse Th17 / 23 e il suo ruolo nella SA e IMID correlate, prima di descrivere strategie terapeutiche attuali e future che puntano a queste risposte nella SA.

---

<sup>15</sup> Il microbiota umano è l'insieme di microorganismi simbiotici che si trovano nel tubo digerente dell'uomo.

### 5.3 Risposte Th17 e l'asse IL-17/23

Le cellule Th17 sono un sottogruppo delle cellule T helper, evolutivamente distinte dalle cellule Th1 e Th2, che producono IL-17 insieme ad altre citochine proinfiammatorie, come IL-6, IL-22, IL-26, interferone (IFN) -  $\gamma$  ed il fattore di necrosi tumorale (TNF) -  $\alpha$  [6]. Di questi, sottoinsiemi a ed F di IL-17 e IL-26 sono considerati i più specifici della risposta Th17 [169].

E' stato segnalato che IL-17 aumenta il priming delle cellule T e stimola vari tipi di cellule, inclusi i fibroblasti, le cellule endoteliali, i macrofagi e le cellule epiteliali, per produrre mediatori proinfiammatori (come IL-1, IL-6, TNF-  $\alpha$  e chemochine).

E' stato dimostrato che IL-17 funziona principalmente durante la fase effettrice di una risposta infiammatoria [170]. È interessante notare, che è stato dimostrato che lo sviluppo di cellule Th17 murine da cellule T native è stato inibito da IFN-  $\gamma$  e IL-27 (citochine della risposta Th1), e IL-4 e IL-25 (noto anche come IL-17E; associato con le risposte Th2) [169], confermando la sua distinzione dagli altri sottogruppi di cellule T. IL-22 ed il fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF) possono essere prodotti dalle cellule Th17 o da popolazioni Th correlate, ma probabili [171].

La ricerca sui trigger ed i driver delle risposte Th17 ha identificato un ruolo importante della citochina IL-23, che è stato descritto da Oppmann et al., ed è risultata espressa in monociti, macrofagi, cellule dendritiche, cellule T e B e cellule endoteliali murini attivati ed umani [172].

Aggarwal et al. hanno scoperto che l'attivazione delle cellule T in presenza di IL-23 ha portato all'espansione delle cellule Th17, determinando così un aumento dei livelli di IL-17 (Figura 7) [173].

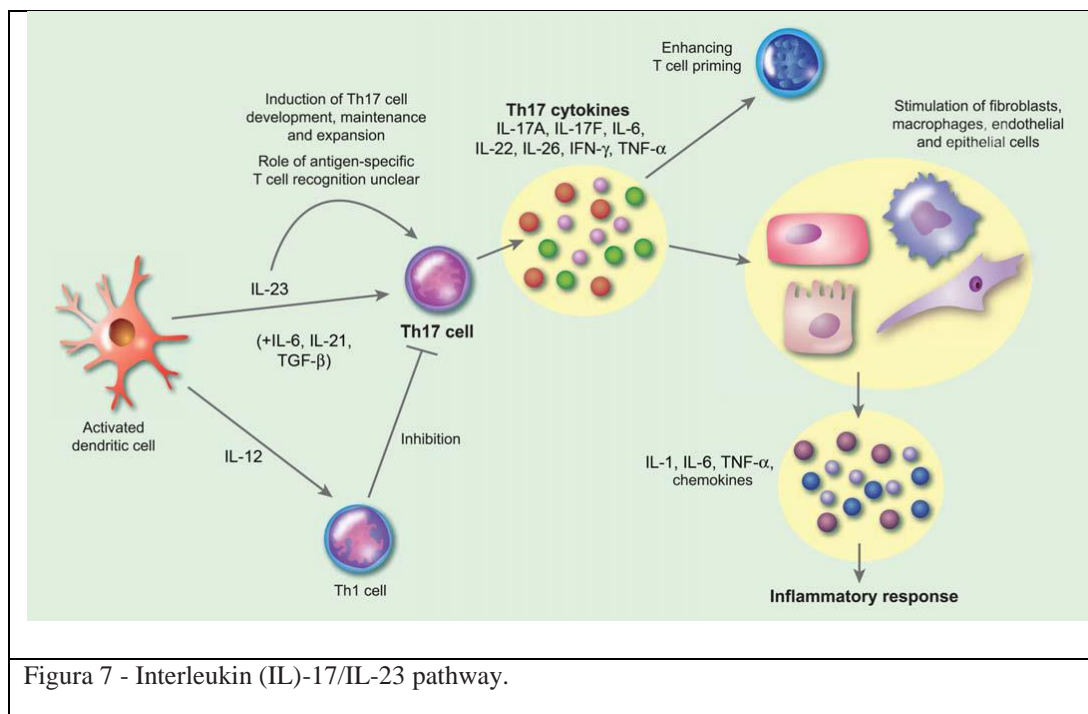


Figura 7 - Interleukin (IL)-17/IL-23 pathway.

Il lavoro di Sherlock e Cua ha dimostrato che la sovraespressione di IL-23 è sufficiente ad indurre una malattia infiammatoria con entesite nei topi, che è simile alla SA umana [174].

È interessante notare, che IL-23 ha dimostrato di essere in grado di indurre la secrezione di IL-17 da parte delle cellule non-T in un ambiente infiammatorio e che, anche se IL-23 sembra essere cruciale nell'infiammazione dei tessuti localizzati, non è necessaria nelle risposte infiammatorie sistemiche [175].

IL-23 è un membro della famiglia della citochina IL-12 e, della subunità p40 collegata a IL-12, ma ha anche una catena p19 unica [173]. Viene prodotto principalmente dalle cellule mieloidi attivate,



dalle cellule endoteliali e epiteliali, e media la segnalazione tramite il suo complesso eterodimerico del recettore IL-23, costituito da una subunità unica del recettore IL-23 (IL-23R) accoppiata con una subunità in comune IL-12R b1 condivisa con il recettore IL-12 [176]. Né la catena IL-12Rb1 né IL-23R hanno attività di segnalazione intrinseca e sono entrambe associate con proteine intracellulari per indurre la segnalazione a valle [169].

E' stato dimostrato che IL-12 ha importanza nello sviluppo di cellule Th1; IL-23, tuttavia, pur avendo una struttura molecolare simile al resto della famiglia, ha effetti distinti [167]. Cua et al. hanno intrapreso uno studio su topi senza la subunità IL-23p19, ed hanno scoperto che dopo l'immunizzazione hanno sviluppato normali risposte Th1, ma non avevano le cellule che producono IL-17, indicando che l'IL-23, piuttosto che IL-12, aveva indotto lo sviluppo delle cellule Th17; questa scoperta è stata poi confermata quando la somministrazione esogena di IL-23 ha portato ad amplificazione della quantità di cellule Th17 [177].

Veldhoen et al. hanno in seguito suggerito che IL-23 probabilmente agisce sulle cellule Th17 precedentemente differenziate per indurre amplificazione e stabilizzazione, invece di portare alla differenziazione della stessa Th17 [178].

L'analisi funzionale di IL-17 ha rivelato il suo ruolo unico nello stimolare la difesa epiteliale contro i batteri Gram-negativi ed i funghi; per esempio, Ye et al. hanno scoperto che i topi senza il recettore IL-17 erano significativamente più suscettibili alle infezioni causate da *Klebsiella* e *Candida* [179].

Inoltre, è stato dimostrato che particolari organismi (come per esempio, *Klebsiella*, *Mycobacterium tuberculosis* e funghi) stimolano le risposte Th17 [167,180].

Così, le risposte Th17 sono caratterizzate dalla produzione di IL-17 (così come altre citochine pro-infiammatorie) e dipendono in misura significativa da IL-23 per l'espansione e la manutenzione del loro fenotipo, dando origine al concetto dell'asse IL-17/23.

#### **5.4 Le risposte Th17 in malattie infiammatorie autoimmuni**

Un sempre crescente numero di evidenze sostiene il ruolo di Th17 in molteplici malattie infiammatorie umane.

Così, mentre i primi studi hanno suggerito che lo sviluppo di malattie infiammatorie era legato alle risposte Th1, in quanto i pazienti con queste condizioni dimostrano elevati livelli di IL-12 e IFN- $\gamma$ , nuove prove da studi in numerose condizioni infiammatorie (come la sclerosi multipla [181 -183], malattia infiammatoria intestinale [183], la psoriasi [184-186] e l'artrite infiammatoria [187-192]) suggeriscono l'importanza dei percorsi alternativi delle citochine - in particolare la risposta Th17. Una certa confusione era dovuta al fatto che la citochina IL-12 della risposta Th1 e la citochina IL-23 che promuove la risposta Th17 hanno in comune la subunità p40 [173].

#### **5.5 Patogenesi della SA**

La SA è una forma di spondiloartrite che causa malattia infiammatoria

cronica e progressiva caratterizzata da sacroileite e infiammazione assiale, con il potenziale di causare erosione ossea, formazione di nuovo tessuto osso e anchilosi della colonna vertebrale [193].

La gravità della malattia dipende dal grado di infiammazione acuta che provoca dolore e rigidità e dalla formazione di nuovo tessuto osseo che provoca una riduzione della mobilità della colonna vertebrale [193], e da caratteristiche extra-articolari che potrebbero coinvolgere gli occhi, il cuore, i polmoni e l'intestino.

Per molti anni è stato noto che HLA-B27 avesse una forte associazione con la SA, dato che il 94% dei pazienti erano HLA-B27-positivi rispetto a solo il 9,5% della popolazione generale [194]. Anche un certo numero di condizioni clinicamente correlate condividono una elevata prevalenza di positività all'HLA-B27 e, tutte insieme vengono definite spondiloartropatie. Queste condizioni includono l'artrite giovanile collegata ad entesite (circa il 70% B27<sup>+</sup>), l'artrite reattiva (30- 70%), la spondiloartrite collegata a colite (33-75%) e spondiloartrite psoriasica (40-50%) [195].

Il ruolo specifico di HLA-B27 nel processo infiammatorio è in gran parte sconosciuto, ma sono stati postulate diversi meccanismi:

- 1) peptide artritogenico,
- 2) misfolding della proteina HLA-B27 con conseguente stress intracellulare,
- 3) riconoscimento immunitario innato dell'espressione aberrante della molecola HLA-B27 [195].

Ulteriori studi, tuttavia, hanno dimostrato che la sola positività HLA-B27 non è sufficiente a causare infiammazione.

Anche se vi è una forte componente ereditaria allo sviluppo di

malattie, Browne et al. hanno dimostrato che il tasso di concordanza per la positività di HLA-B27 in gemelli dizigoti era notevolmente inferiore a quello in gemelli monozigoti (24 e 63%, rispettivamente), suggerendo la presenza di altri geni rilevanti [196].

Evans et al. hanno dimostrato che i polimorfismi di ERAP1 (un gene coinvolto nella rifinitura del peptide prima della presentazione di HLA di classe 1) incide sul rischio di sviluppare spondilite anchilosante nei soggetti con positività di HLA-B27, pertanto, suggerendo che il trattamento aberrante dei peptidi antigenici è significativo nella patogenesi della malattia [3].

Inoltre, è stato dimostrato che anche i geni IL-1A e IL-23A sono rilevanti [197] (Tabella 4).

Tabella 4 - Examples of genes implicated in ankylosing spondylitis [35] (Esempi di geni implicati nella spondilite anchilosante).		
Gene	Locus	Function (example)
HLA-B	6p21-3	Immune recognition
ERAP1	5q15	Aminopeptidase
IL23-R	1p31	Cytokine receptor for Th17 responses
IL-1A	2q14	Proinflammatory response
STAT-3		Th17 signalling
HLA 5 human leucocyte antigen; ERAP 5 endoplasmic reticulum aminopeptidase; IL – interleukin; STAT 5 signal transducer and activator of transcription; Th17 5 T helper type 17 (HLA 5 leucocyte antigene umano; ERAP 5 reticolo endoplasmatico aminopeptidase; IL - interleuchina; STAT 5 trasduttore di segnale e Attivatore di trascrizione; Th17 5 (T helper di tipo 17)).		

## 5.6 Le risposte Th17 nella spondilite anchilosante

Cortes et al. hanno segnalato un GWAS in pazienti affetti da AS ed hanno identificato una rappresentazione eccessiva dei geni coinvolti nella via Th17 associata con SA, ed hanno specificamente identificato un ruolo importante per IL-23 [36]; inoltre, anche il dominio 9 di attivazione e reclutamento delle caspasi (un gene coinvolto nella via di segnalazione seguente l'induzione fungina di IL-23 nelle cellule dendritiche) e trasduttori del segnale ed attivazione della trascrizione 3 (STAT-3, che codifica la principale molecola di segnalazione attivata da IL-23R) sono stati trovati in associazione con la SA (e malattia di Crohn) [193].

In linea con questo, gli studi hanno rivelato una significativamente più alta incidenza di cellule IL-23-positive nel midollo osseo subcondrale in pazienti affetti da SA rispetto ai controlli, in aggiunta a precedenti lavori che avevano dimostrato elevati livelli sierici di IL-17 e IL-23 ed aumentate concentrazioni di IL-23 nel liquido sinoviale [193].

Inoltre, questo gruppo ha trovato che le cellule IL-23-positive erano sensibilmente più presenti rispetto alle cellule IL-12-positive, a significare che le vie che coinvolgono IL-23 sono probabilmente più significative.

È stato dimostrato che vari polimorfismi nel gene IL-23R sono associati con SA [199,200].

A causa di linkage disequilibrium<sup>16</sup> è difficile determinare esattamente

---

<sup>16</sup> Il *linkage disequilibrium* (LD) è un termine dell'ambito genetico che indica la presenza di associazione statistica tra specifici alleli relativi a due o più loci, che costituiscono di solito un particolare aplotipo ancestrale, diffuso nella popolazione in cui è rilevato perché trasmesso lungo la discendenza da un comune progenitore.

quali potrebbero essere patogeni; sembra che ci sia un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) 'primario' associato ad SA, che altera la sequenza aminoacidica della porzione di segnalazione intracellulare di IL-23R, così come associazioni secondarie con probabile funzione di regolamentazione [201].

Chan et al. hanno ipotizzato che l'espressione aberrante della molecola HLA-B27 nella spondiloartrite può agire attraverso le cellule che contengono il recettore killer immunoglobuline-like 3DL2 (KIR3DL2, un recettore delle cellule natural killer per l'omodimero dell'antigene HLA-B27) e, cosa molto interessante, ha dimostrato una maggiore espressione di questo recettore sulle cellule natural killer e le cellule T CD4<sup>+</sup> in pazienti con spondiloartrite e artrite collegata ad entesite [202]. Il legame degli omodimeri dell'antigene HLA-B27 alle cellule KIR3DL2-positive può stimolare la produzione di IL-17, e le cellule T CD4 positive per KIR3DL2 nel liquido sinoviale di pazienti con spondiloartrite dimostrano un' aumentata secrezione di IL-17 [195]. In particolare, un aumento del numero di cellule IL17-associate è stato dimostrato anche nelle faccette articolari di pazienti con spondilite anchilosante, includendo sia le cellule T che le cellule non linfocitarie [203].

DeLay et al. hanno dimostrato in modelli di ratti transgenici HLA-B27 per la spondiloartropatia che l'asse IL-23 / IL-17 viene attivata fortemente nel colon e che la risposta delle proteine unfolded al misfolding delle proteine HLA-B27 nei macrofagi possono portare ad un' aumentata induzione di IL-23, sostenendo un potenziale legame tra il misfolding di HLA-B27 e la disregolazione immunitaria [204].

È interessante notare che, Payeli et al. hanno dimostrato che un anticorpo monoclonale HD6, che si legava specificamente alle cellule mononucleate sia del sangue che del liquido sinoviale con espressione anormale di HLA-B27, ha inibito la produzione di IL-17 in cellule di pazienti SA [205].

Rispetto ai precedenti studi su pazienti con artrite reumatoide e artrite psoriasica, Appel et al. hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule che producono IL-17 in pazienti affetti da SA sono neutrofili mieloperossidasi e CD15-positivi anziché cellule T CD3<sup>+</sup> e mastociti, suggerendo che le cellule che producono IL-17 diverse dalle cellule Th17 sono rilevanti nelle infiammazioni locali [203].

Sherlock et al. hanno dimostrato in modelli murini di spondiloartrite che IL-23 media la malattia, e che l'introduzione di IL-23 esogeno in topi normali altrimenti normali era sufficiente per indurre le caratteristiche della spondiloartrite. Essi hanno mostrato che l'IL-23 agisce sulle cellule T positive per vari recettori [IL23R, recettore orfano  $\gamma$  t collegato a RAR (ROR-  $\gamma$  t) e l'antigene delle cellule staminali di tipo 1 (Sca1)], che permettono alle entesi di rispondere a IL-23 in assenza di ulteriore reclutamento cellulare e induce i mediatori infiammatori come IL-6, IL-17, IL-22 e le chemochine (motivo ligando di tipo 1C-X-C); questo studio supporta i risultati ottenuti anche da altri gruppi secondo i quali la fonte di IL-23 potrebbe essere da parte di cellule mieloperossidasi (MPO)-positive, risultati in contraddizione con studi precedenti che suggerivano che i macrofagi potrebbero essere la fonte primaria [193].

## 5.7 Gestione della SA

I farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) e la fisioterapia sono i cardini del trattamento della SA [206]. Farmaci anti-reumatici modificanti la malattia (DMARD), ampiamente utilizzati nel trattamento dell'artrite reumatoide, sono inefficaci per l'infiammazione assiale in SA.

In alcuni pazienti, anche i farmaci anti-TNF, tra cui gli anticorpi monoclonali (mAbs) infliximab, adalimumab e golumimab ed il recettore ricombinante etanercept, hanno dimostrato di essere utili [207]. Tuttavia, fino al 40% dei pazienti o non riescono a tollerare o non rispondono a questo trattamento, ed attualmente non vi sono altre alternative terapeutiche approvate disponibili, suggerendo che sono necessarie terapie alternative [206].

## 5.8 Le attuali strategie che mirano alle risposte Th17 in SA

Diverse terapie che mirano ad aspetti della risposta Th17 sono state sperimentate in numerose IMID e finora hanno mostrato risultati promettenti (Tabella 5). In seguito precedenti studi promettenti alla fasi II e III di secukinumab (un anticorpo monoclonale contro IL-17A) nel trattamento della psoriasi e dell'artrite psoriasica, Baeten et al. hanno eseguito un trial in doppio cieco randomizzato con secukinumab nei pazienti con SA ed hanno trovato un miglioramento nei punteggi ASAS 20 (cioè i pazienti hanno raggiunto un miglioramento del 20% nei criteri ASAS) nel 59% dei pazienti rispetto al 24% trattato con placebo in un periodo di 6 settimane [206 ].



Tabella 5 - Potential therapies targeting interleukin (IL)-17/IL-23 pathways (Percorsi mirati interleuchina IL-17 / IL-23 di potenziali terapie)

Drug action (azione-farmaco)	Examples	Trials (Prove)		
Anti-IL-17A	Secukinumab	Cosentyx	Phases II/III	Psoriasis, ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis
	Ixekizumab		Phase III	Psoriasis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis
	Perakizumab		Phase I	Rheumatoid arthritis
Anti-IL-17R	Brodalumab		Phase III	Psoriasis, psoriatic arthritis, Crohn's disease, rheumatoid arthritis
Anti-IL-23 p19	Tildrakizumab		Phase II	Psoriasis
	Guselkumab		Phase II	Psoriasis
Anti-IL-12/23	Ustekinumab	Stelara	Phase III	Psoriasis,* psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, multiple sclerosis
	Briakinumab		Phase IIb	Rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, multiple sclerosis

\*Currently in routine clinical use in the United Kingdom following National Institute for Health and Care Excellence (NICE) guidance (Attualmente in uso clinico di routine nel Regno Unito in seguito Istituto Nazionale per la Salute e cura eccellenza di guida (NICE)).

Inoltre, l'analisi bayesiana ha specificato che secukinumab provoca tassi di risposta migliorati con una probabilità del 99,8% rispetto al placebo. In questo studio, è stata misurata anche la qualità della vita, ed è stato osservato un miglioramento nel 52% del gruppo trattato rispetto al 33% del gruppo placebo; questo è stato associato ad un miglioramento dei livelli della proteina C-reattiva (PCR), della velocità di eritrosedimentazione (VES) e di S100A9 (una proteina biomarker infiammatorio) a 6 settimane. Inoltre, un miglioramento del punteggio ASAS è stato correlato in modo significativo con un cambiamento dei livelli S100A8/9. L'imaging radiologico è stato eseguito su questi pazienti a 6 e 28 settimane e, curiosamente, i punteggi della risonanza magnetica (MRI) riguardo le lesioni infiammatorie assiali erano migliorati nel gruppo secukinumab, suggerendo un miglioramento dei sintomi clinici così come del danno articolare.

Questi risultati incoraggianti sono stati confermati in studi più ampi presentati presso l'American College of Rheumatology (ACR) nel 2014. Baeten et al. hanno eseguito un trial randomizzato e controllato di fase III di secukinumab lungo 52 settimane su 371 pazienti, ed hanno trovato un miglioramento significativo sia degli segni che dei sintomi di SA che persistevano per tutta la durata dello studio [208]. Inoltre, un altro studio di fase III condotto da Deodhar et al. ha dimostrato che secukinumab produce miglioramenti sia rapidi che sostenuti in risultati riferiti dai pazienti, come la fatica, la produttività e la qualità della vita [209].

Anche l'ustekinumab<sup>17</sup> ha dimostrato di essere utile nel trattamento della SA.

Poddhubnyy et al. hanno eseguito uno studio proof-of-concept con ustekinumab su 20 pazienti che sono stati seguiti per un periodo di 24 settimane [210] ed hanno trovato un miglioramento  $\geq 50\%$  del punteggio BASDAI nel 55% dei pazienti. Inoltre, il 50% e il 20% dei pazienti, rispettivamente, ha raggiunto il punteggio di miglioramento clinicamente importante sulla scala ASDAS; notevolmente, alla settimana 24, il 25% dei pazienti ha ottenuto un punteggio ASDAS  $<1,3$ , il che implica malattia inattiva. Sono stati osservati anche miglioramenti dei parametri di outcome riferiti dai pazienti e miglioramento del punteggio RM. Sono attualmente in corso studi di fase II di questo trattamento nella SA.

---

<sup>17</sup> Ustekinumab è un anticorpo monoclonale IgG interamente umano prodotto in una linea cellulare di mieloma murino, usando la tecnica del DNA ricombinante.

## 5.9 I rischi delle terapie che mirano all'asse IL-17/23

Finora, tutti gli studi riportano un favorevole profilo di sicurezza di rischio-beneficio, con i principali eventi avversi, tra cui le infezioni da Candida e la neutropenia [206]; è stata osservata anche leucopenia. Nello studio di Baeten et al., un paziente ha sviluppato un ascesso da stafilococco aureus sottocutaneo che necessitava un intervento chirurgico [206].

## 5.10 Il futuro del trattamento della SA

Puntare a percorsi molecolari specifici comporta numerosi benefici:

- ✓ benefici in pazienti che non riescono a rispondere ai trattamenti convenzionali,
- ✓ miglioramento nella malattia assiale,
- ✓ limitazione della progressione della malattia e potenzialmente induzione della remissione clinica,
- ✓ percorsi specifici degli obiettivi = effetti collaterali limitati,
- ✓ ben tollerato dai pazienti negli studi clinici in corso.

Finora, gli studi delle terapie che puntano alla via Th17 in SA sono stati diretti solo contro IL-17A e IL-23, gli inibitori contro IL-17R e IL-23R. Sono attualmente in fase di sviluppo piccole molecole che mirano a fattori di trascrizione chiave dell'asse IL-17, come ROR  $\gamma$ , tutti degni di dettagliati studi pre-clinici e clinici [211]. Anche le piccole molecole inibitrici che mirano le molecole di segnalazione chiave come Janus chinasi 2 (JAK2), STAT-3 e la tirosina chinasi 2 (Tyk2) saranno promettenti candidati per le sperimentazioni terapeutiche in AS ed IMID correlati.

## CAPITOLO 6

### **BIOMARCATORI PER LA DIAGNOSI, IL MONITORAGGIO DELLA PROGRESSIONE, E LE RISPOSTE DI TRATTAMENTO NELLA SPONDILITE ANCHILOSANTE - RISULTATI DELLE ULTIME RICERCHE**

## 6.1 Generalità

In questa ricerca, che è stata effettuata negli Stati Uniti e pubblicata nel 2015 [214], sono stati esaminati ampiamente biomarcatori del siero e del plasma nel valutare l'attività della SA, la risposta al trattamento, come predittori o per la gravità radiografica.

Per valutare l'attività della malattia la maggior parte del lavoro è stato svolto nell'esame delle citochine (in particolare l'interleuchina 17 e 23), dei marcatori metalloproteinasi della matrice (MMP) (in particolare MMP3).

Per valutare le persone a più alto rischio di progressione radiografica, i biomarcatori più ampiamente valutati sono stati quelli del metabolismo osseo, della cartilagine e dei prodotti di degradazione del tessuto connettivo, e delle adipochine.

Il problema è che non è stato dimostrato in maniera riproducibile nessun biomarcatore capace di valutare l'attività della malattia o di predirne l'esito, e questo rimane ancora un bisogno insoddisfatto.

I dati più recenti di NHANES 2009 - 2010 riportano negli Stati Uniti una frequenza di mal di schiena cronico di quasi il 20% in quelli di età compresa tra 20 e 70 anni [90]. Di questi, fino a un terzo avevano mal di schiena infiammatorio (IBP) [90, 91]. IBP è un segno distintivo della spondiloartrite assiale (AxSpA), che si verifica in circa il 25% di quelli con IBP [92].

Oltre alla diagnostica per immagini, non vi è alcuna prova diretta per la diagnosi di SA. Non vi è alcun marcatore sierologico o di sangue specifico della malattia.

L'attività della malattia nella SA è stata misurata mediante l'indice<sup>[18]</sup> BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) [93], che prevede solo misure riferite dai pazienti stessi.

Anche se ampiamente utilizzato dopo essere descritto per la prima volta nel 1994, ha delle note limitazioni. L'indice non include la valutazione del medico della malattia e non valuta l'impatto dei fattori clinici specifici. L'indice BASDAI contiene inerente ridondanza alle domande e non è specifico per la vera infiammazione (al contrario del dolore di altre fonti).

La Società Internazionale per la Valutazione della Spondiloartrite (ASAS) ha sviluppato un nuovo punteggio dell'attività della malattia SA (ASDAS) che combina le valutazioni riferite dai pazienti con i reagenti della fase acuta (proteina C-reattiva [PCR] o velocità di eritrosedimentazione [VES]) [94].

ASDAS riconosce i pazienti con diversi livelli di attività della malattia ed è sensibile nel tempo, quindi potenzialmente utile in studi clinici. Tuttavia, anche ASDAS è in gran parte basato su misure soggettive, e quello che manca è un biomarcatore completo ed obiettivo dell'attività della malattia.

La gravità della malattia viene tipicamente misurata dalla metrologia, la compromissione funzionale (l'indice Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI)<sup>[19]</sup>) [95], e la gravità radiografica, più comunemente misurata dal Punteggio della Gravità della spondilite anchilosante (mSASSS) modificato [96].

---

<sup>18</sup> Indice dell'attività della malattia.

<sup>19</sup> Indice composito che valuta le capacità funzionali del paziente.

Per la classificazione della spondilite anchilosante è necessaria la presenza di sacroileite visibile nella radiografia [97]. Tuttavia, l'infiammazione ed il dolore precedono di molti anni la sacroileite radiografica [98].

Al fine di catturare la malattia in precedenza, è stato formulato il concetto di AxSpA, sulla base di prove di infiammazione attiva delle articolazioni sacroiliache sulla risonanza magnetica (MRI) e/o una combinazione di altri risultati.

Sono stati redatti dei criteri di classificazione dalla Società Internazionale per la Valutazione della Spondiloartrite (ASAS) per facilitare la diagnosi precoce di AxSpA [2].

Tuttavia, sarebbe particolarmente utile trovare un biomarcatore per identificare quelli a più alto rischio per la progressione da AxSpA a SA o di quelli a più alto rischio per la rapida progressione radiografica a fusione spinale. AxSpA può progredire a SA in una grande percentuale di pazienti ed in qualcuno potrebbe causare fusione e completa rigidità della colonna vertebrale, che è irreversibile.

Possono essere necessari fino a 10 anni prima che la sacroileite possa essere chiaramente rilevata mediante radiografia convenzionale [98] - ritardi critici prima di iniziare nuove ed efficaci terapie.

Considerando che i dati osservazionali suggeriscono che l'intervento precoce nella SA è più efficace a rallentare la progressione radiografica [100], l'identificazione precoce è importante per prevenire l'incapacità causata da questa malattia. Inoltre, le nuove terapie sono costose e piene di effetti collaterali.

L'identificazione di questi pazienti con maggiori probabilità di rispondere a queste terapie sarebbe una preziosa aggiunta all'attuale armamentario del trattamento.

## **6.2 Marcatori genetici**

Questo studio si concentra sul ruolo dei marcatori, della genetica, del sangue e della membrana sinoviale, nella gestione della SA e della AxSpA, nella diagnosi, nella determinazione dell'attività della malattia, ed a prevedere quelli a rischio di un esito peggiore.

### **6.2.1 HLA-B27**

HLA-B27 non è stato incluso nei criteri di classificazione di New York modificati per la SA [93], questo allele HLA è parte integrante dei nuovi criteri ASAS per la SpA assiale [100].

La prevalenza di HLA-B27 varia tra le diverse etnie.

In un recente sondaggio nazionale degli Stati Uniti, la sua prevalenza è stata del 7,5% tra i bianchi non-ispanici mentre era inferiore al 4,6% nei messicani americani e circa del 1,1% tra i neri non-ispanici [101]. Mentre l'85 - 95% dei pazienti SA bianchi avevano l'allele HLA-B27, solo il 7 - 8% dei portatori di HLA-B27 nella popolazione generale sviluppano la SA.

Questo significa che un test positivo per HLA-B27 non è sufficiente per la diagnosi di SA. Inoltre, la prevalenza di HLA-B27 è sostanzialmente più bassa tra i pazienti SA afro-americani, il 50%



[94]. In termini di caratteristiche della malattia, HLA-B27 è associato ad esordio della malattia ad una giovane età, sviluppo di uveite anteriore, e storia familiare positiva di SpA tra i pazienti SA, ma non è associato ad un aumento di danni strutturali visibili nelle radiografie.

HLA-B27 è particolarmente utile nella diagnosi di AxSpA non radiografica.

In uno studio longitudinale con un tempo di follow-up medio di 7,7 anni, la combinazione di grave sacroileite alla risonanza magnetica con positività di HLA-B27 era stato dimostrato essere un eccellente predittore del futuro sviluppo della SA [102].

L'utilità di HLA-B27 nel determinare chi trarrebbe beneficio dalla valutazione reumatologica in cure primarie è stata dimostrata anche in un recente studio internazionale. I pazienti con mal di schiena cronico (> 3 mesi) ed età di insorgenza prima dei 45 anni che avevano o la positività di HLA-B27 o il mal di schiena infiammatorio o sacroileite alla risonanza magnetica sono stati mandati dai reumatologi per un'ulteriore valutazione.

A seguito di questa semplice strategia di riferimento, al 35% dei pazienti è stata diagnosticata la SpA [14]. Al di fuori di HLA-B27, altri geni MHC che sono stati implicati nella predisposizione alla malattia includono altri alleli HLA-B (B\*40:01) e MICA.

### 6.2.2 Geni non-MHC

Ad oggi, sono stati identificati più di 41 geni per la predisposizione della SA. La stragrande maggioranza di questi geni sono al di fuori del

MHC e comprendono geni coinvolti nell'immunità Th17 mediata (IL23R, TYK2, IL6R, IL7R?, IL7?, IL1R2/IL1R1, IL12B), nella presentazione di peptidi (proteine MHC di classe I, ERAP1, UBE2E3, UBE2L3, NPEPPS), nella funzione delle cellule T CD8 (RUNX3, EOMES, IL7R), nel rilevamento microbico (CARD9, NOS2), così come geni coinvolti in altre o poco chiare funzioni immunologiche (ZMIZ1, FCGR2A, KIF21B, SH2B3, TNFRSF1A, GPR65, SULT1A1, GPR35, BACH2, ICOSLG, NKX2-3) [104].

Questi dati ci pongono la domanda: i test genetici possono essere utilizzati per diagnosticare la SA? Oltre 41 geni sono stati implicati nel rischio di SpA; ma a parte HLA-B27 ed altri geni MHC (MICA, HLA-B40), la quantità di rischio imposta dai singoli geni non MHC è molto piccola [104] (Tabella 6).

Tabella 6 - The relative impacts of genes associated with AS identified by genome-wide association studies on disease susceptibility (Impatti relativi a geni associati con SA identificati da studi di associazione genome-wide sulla suscettibilità alla malattia)

Locus	Gene	SNP	Odds ratio <sup>[20]</sup>	Heritability explained (ereditabilità spiegata)(%)
1p36	<i>RUNX3</i>	rs6600247	1.164	0.138
1p31	<i>IL23R</i>	rs11209026	1.650	0.352
1p31	<i>IL23R</i>	rs12141575	1.147	0.100
1q21	<i>IL6R</i>	rs4129267	1.176	0.151
1q23	<i>FCGR2A</i>	rs1801274	1.123	0.080
1q23	<i>FCGR2A</i>	rs2039415	1.088	0.037
1q32	<i>GPR25-KIF21B</i>	rs41299637	1.201	0.162
1q32	<i>HHAT</i>	rs12758027	1.094	0.048
2p15	Intergenic	rs6759298	1.308	0.407
2q11	<i>IL1R2-IL1R1</i>	rs4851529	1.103	0.055
2q12	<i>IL1R2-IL1R1</i>	rs2192752	1.112	0.047

<sup>20</sup> In epidemiologia l'**odds ratio** (OR) è la misura dell'associazione tra due fattori, per esempio tra un fattore di rischio e una malattia

Locus	Gene	SNP	Odds ratio <sup>[20]</sup>	Heritability explained (ereditabilità spiegata)(%)
2q31	<i>UBE2E3</i>	rs12615545	1.109	0.062
2q37	<i>GPR35</i>	rs4676410	1.131	0.060
3p24	<i>EOMES</i>	rs13093489	1.119	0.067
5p13	<i>PTGER4</i>	rs12186979	1.093	0.047
5p13	<i>IL7R</i>	rs11742270	1.113	0.054
5q15	<i>ERAP1</i>	rs30187	1.318	0.411
5q15	<i>ERAP1</i>	rs1065407	1.171	0.136
5q15	<i>ERAP2</i>	rs2910686	1.171	0.147
5q33	<i>IL12B</i>	rs6871626	1.117	0.066
5q33	<i>IL12B</i>	rs6556416	1.107	0.054
6p21	<i>HLA-B*27/MICA</i>	rs116488202	60	20.089
6p21	<i>HLA-A*02</i>	rs2394250	1.214	0.220
6q15	<i>BACH2</i>	rs17765610	1.172	0.064
6q15	<i>BACH2</i>	rs639575	1.081	0.034
7q31	<i>GPR37</i>	rs2402752	1.108	0.052
9q34	<i>CARD9</i>	rs1128905	1.124	0.082
10q22	<i>ZMIZ1</i>	rs1250550	1.110	0.059
10q24	<i>NKX2-3</i>	rs11190133	1.181	0.136
12p13	<i>LTBR-TNFRSF1A</i>	rs1860545	1.131	0.086
12p13	<i>LTBR-TNFRSF1A</i>	rs7954567	1.113	0.062
12q24	<i>SH2B3</i>	rs11065898	1.129	0.060
14q31	<i>GPR65</i>	rs11624293	1.234	0.086
16p11	<i>IL27-SULT1A1</i>	imm_16_285 25386	1.112	0.064
16p11	<i>IL27-SULT1A1</i>	rs35448675	1.236	0.007
17q11	<i>NOS2</i>	rs2531875	1.122	0.074
17q11	<i>NOS2</i>	rs2297518	1.129	0.055
17q21	<i>NPEPPS- TBKBP1-TBX21</i>	rs9901869	1.146	0.111
19p13	<i>TYK2</i>	rs35164067	1.155	0.080
19p13	<i>TYK2</i>	rs6511701	1.098	0.036
21q22	Intergenic	rs2836883	1.190	0.140
21q22	<i>ICOSLG</i>	rs7282490	1.100	0.052
22q11	<i>UBE2L3</i>	rs2283790	1.124	0.052

Infatti, si stima che attualmente è conosciuto solo il 25% del contributo genetico alla predisposizione complessiva della malattia, il resto proveniente da cose come: le rare varianti genetiche (che non sarebbero rilevate dall'approccio standard GWAS), variazione del numero di copie di geni (tra cui inserzioni e delezioni), i fattori epigenetici, e la varianza aggiunta fornito dall'interazione gene:gene non è attualmente riconosciuto.

### **6.3 Marcatori dell'attività della malattia**

#### **6.3.1 La velocità di eritrosedimentazione (VES) e la proteina**

##### **C-reattiva (PCR)**

PCR e VES sono i due “marker” (marcatori) dell'attività di una malattia più comunemente utilizzati nella pratica clinica e nei test clinici.

Tuttavia, entrambi hanno una bassa sensibilità e specificità [108] e non rappresentano in maniera esaustiva il processo della malattia in SA [109].

Una PCR elevata è inclusa nei criteri di classificazione ASAS della AxSpA nonché nell'ASDAS, una misura dell'attività della malattia [2]. Tuttavia, una PCR o VES elevata è presente solo in circa 40 - 50% dei pazienti con SA [110].

Così, una VES o PCR normale non esclude la presenza di SA né cattura completamente l'attività della malattia. I livelli di entrambi i reagenti di fase acuta sono più alti nei pazienti con SA che in SpA assiale non radiografica [111].

La PCR elevata è anche associata ad un aumento di cambiamenti radiografici su radiografie della colonna vertebrale [110] e segni di infiammazione su risonanza magnetica del sacro-iliaco [112].

Inoltre, un aumento di PCR e VES prevede future progressioni radiografiche delle articolazioni sacro-iliache e della colonna vertebrale in pazienti SA.

### 6.3.2 Citochine

Gli studi dei livelli di citochine sono stati altamente variabili.

Interleuchina 6 (IL-6) è stata quella studiata più ampiamente [71, 114, 116, 117].

IL-6 è una citochina proinfiammatoria classica prodotta da una varietà di cellule immunitarie che induce la produzione di una serie di proteine positive di fase acuta quali il siero amiloide A e la proteina C-reattiva. IL-6 è coinvolta nel procedimento e la manutenzione dell'infiammazione facilitando il traffico dei neutrofili nel sito dell'infiammazione e regola l'attivazione e la differenziazione dei linfociti T. Alcuni studi hanno dimostrato associazioni dei livelli di IL-6 sia con l'attività della malattia che con altri marker infiammatori [71, 114, 116], mentre altri non lo hanno fatto [117, 118].

Interleuchina 17 (IL-17) e IL-23 sono citochine chiave nella via di TH17. Un certo numero di studi hanno riportato elevati livelli di IL-17 e IL-23 nel plasma e nel siero di pazienti SA [116, 118 - 124] e li hanno associati con l'attività della malattia [120, 122], anche se quest'ultimo non è stato osservato in tutti pazienti [119, 121].

Interleuchina 33 (IL-33) è un membro della famiglia di IL-1 ed è stata recentemente coinvolta in diverse malattie infiammatorie e autoimmuni. IL-33 può essere prodotta da vari tipi di tessuti e cellule e induce l'espressione genica di citochine Th2-associate tramite il legame al recettore orfano ST2.

### 6.3.3 Metalloproteinasi della matrice

Le Metalloproteinasi della matrice<sup>[21]</sup> (MMP) sono endopeptidasi zinco-dipendenti che sono coinvolte nella degradazione delle proteine della matrice extracellulare, tra cui la scissione di recettori della superficie delle cellule, il rilascio di ligandi apoptotici e l'inattivazione di chemochine/citochine.

Si pensa che le MMP svolgano un ruolo importante in comportamenti cellulari come la proliferazione cellulare, la migrazione (adesione/dispersione), la differenziazione, l'angiogenesi, l'apoptosi, e la difesa dell'ospite.

Diversi studi hanno esaminato i livelli sierici delle MMP in SA, in particolare MMP3 [117, 125 - 133], MMP8 [126], MMP9 [127], TIMP-1 [125, 126] e -2 [125]. E' stato dimostrato che elevati livelli di MMP3 riflettono l'attività della malattia e la risposta al trattamento, anche se questo non è stato osservato universalmente [127, 132, 133].

E' stato anche dimostrato che MMP3 è un predittore indipendente della progressione del danno strutturale in pazienti con SA [134].

---

<sup>21</sup> Le metalloproteinasi costituiscono una vasta famiglia di enzimi, tra cui emergono per importanza le metalloproteinasi di matrice (MMP, *Matrix MetalloProteinases*) o matrixine, tutte caratterizzate da un dominio catalitico che lega lo zinco.

Un altro recente studio ha esaminato 30 potenziali biomarcatori e ha scoperto che MMP8 e MMP9 (e non MMP3) sono meglio associati con l'attività della malattia [127] .

#### **6.3.4 Osteoprotegerina (OPG)**

Osteoprotegerina (OPG) è un membro della superfamiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale (TNF). Le cellule T attivate possono scatenare direttamente la osteoclastogenesi attraverso il ligando di OPG (RANKL).

Alcuni studi hanno descritto i livelli di OPG nei pazienti SA come inferiori [135, 136] mentre altri come più alti [118, 137 - 140] e sono stati correlati con il BASDAI ma non con la risposta al trattamento [137, 140].

#### **6.3.5 Glicoproteina-39 della cartilagine umana (HC gp-39, altrimenti nota come YKL-40)**

YKL-40 è una delle principali proteine secrete dei condrociti articolari umani ed è stata associata con l'attività della malattia in SA. Tuttavia, studi longitudinali non sono riusciti a dimostrare che si comporta bene come altri biomarcatori (cioè, CRP, MMP3) [117].

#### **6.3.6 Proteina oligomerica della matrice cartilaginea (COMP)**

COMP è una proteina della matrice extracellulare che catalizza l'assemblaggio di collagene e favorisce la formazione di fibrilli ben

definiti. Elevati livelli di COMP sono stati riportati in una varietà di malattie articolari infiammatorie, anche se l'associazione con altri “marker” clinici ed altri biomarcatori in SA è incoerente [117].

#### 6.3.7 Aggrecano

Aggrecano è un componente importante della matrice extracellulare della cartilagine. L'entità della sostituzione della catena laterale di glicosaminoglicano nell'aggrecano e la conseguente densità di carica fissa attira contro-ioni ed acqua, con conseguente aumento della pressione che è di fondamentale importanza per le proprietà biomeccaniche della cartilagine.

I pazienti con AxSpA hanno diminuiti livelli di aggrecano totale rispetto ai soggetti sani [117]. Dopo il trattamento anti-TNF, nei responder clinici i livelli sono cambiati avvicinandosi ai livelli normali.

#### 6.3.8 Calprotectina

Calprotectina è un complesso proteico eterodimerico composto dalle subunità S100A8 e S100A9 ed è una delle principali proteine leganti il calcio ed il zinco nel citoplasma dei neutrofili, monociti e cheratinociti. Si è affermata come un “marker” delle malattie infiammatorie croniche intestinali: [141], ed è una delle proteine maggiormente modulata positivamente specificamente espressa nella cute psoriasica lesionale [142].



L'idea della calprotectina come biomarcatore nella SpA non è nuova.

Più di 20 anni fa, Hammer et al. avevano scoperto che la Spa periferica era un “marker” nel plasma dell'infiammazione e della risposta del trattamento nell'artrite reattiva [143].

Successivamente, è risultata in livelli elevati nelle feci di 41% dei pazienti con SA [140].

Anche i livelli sierici delle calprotectina sono significativamente aumentati nella AxSpA ed il trattamento con l'agente anti-TNF riduce in modo significativo i livelli della calprotectina [133]. In un altro studio, i livelli basali sierici della calprotectina erano significativamente più alti nei pazienti con peggioramento di mSASSS rispetto a coloro senza peggioramento [144].

Tabella 7 - Marcatori di attività e risposta al trattamento della malattia.

Marker	Descrizione	Riferimento
Proteina C-reattiva (PCR)	Forse, è il biomarcatore più utilizzato negli studi e nella pratica clinica. Una PCR elevata è presente in circa il 40-50% dei pazienti con AS.	[108–112]
Velocità di eritrosedimentazione (VES)	E' ampiamente utilizzata negli studi e nella pratica clinica. Un aumento della VES è presente solo in circa il 40-50% dei pazienti con SA.	[108–112]
Interleuchina 6 (IL-6)	Livelli di IL-6 elevati nel siero di pazienti SpA rispetto ai controlli e correlati con i livelli di PCR e VES in alcuni, ma non tutti gli studi.	[114–118]
Interleuchina 17 (IL-17)	I livelli di IL-17 sierico erano elevati nei pazienti SpA ed, in uno studio, erano associati a entesite e coinvolgimento delle articolazioni periferiche.	[116–123]
Interleuchina 23 (IL-23)	Diversi studi hanno riportato livelli di IL-23 significativamente più elevato del siero di pazienti SpA rispetto ai soggetti sani, con livelli più alti, in uno studio, nel liquido sinoviale - non visibile in tutti gli studi.	[116–123]
Interleuchina 33 (IL-33)	Livelli elevati in pazienti AS cinesi e correlati con marker clinici e sierologici dell'attività della malattia.	[122–124]

Metalloproteinasi della matrice 3 (MMP3)	I livelli di MMP3 erano significativamente più alti nei pazienti AS rispetto ai controlli sani e sono stati associati con più alta attività della malattia nella maggior parte (ma non tutti) gli studi, ed erano correlati in modo significativo con danni strutturali maggiori.	[117, 125–134]
Metalloproteinasi della matrice 8 (MMP 8)	E' stata associata con l'attività della malattia (BASDAI) e con la compromissione funzionale (BASFI) in uno studio, ma questo necessita di ulteriori conferme.	[127]
Metalloproteinasi della matrice 9 (MMP 9)	E' stata associata con l'attività di malattia in uno studio inglese, risultati non replicati in un secondo in Taiwan.	[126, 127]
Chemochine, pattern CXC, ligando 8 (CXCL8)	Si è correlato con l'attività della malattia in uno studio, ma questo necessita ulteriori conferme.	[127]
Osteoprotegerina (OPG)	Livelli di OPG più elevati in alcuni e inferiori in altri pazienti AS, anche se i pazienti con malattia avevano una concentrazione di OPG significativamente maggiore rispetto al gruppo inattivo. Un altro studio ha dimostrato che OPG è correlata con i marker dell'attività della malattia, come BASDAI ed il dolore spinale VAS. Il trattamento con anti-TNF non ha comportato una riduzione dei livelli di OPG in tre studi.	[118, 136–140]
Fosfatasi alcalina ossea (BAP)	In livelli più alti nei pazienti affetti da AS e SpA rispetto ai controlli, non ci sono stati cambiamenti chiari e coerenti dopo il trattamento biologico.	[140, 148, 152, 155]
Aggrecano	I pazienti con AxSpA avevano, rispetto ai soggetti sani, livelli totali di aggrecano ridotti. Dopo il trattamento con anti-TNF, i livelli sono tornati verso quelli normali.	[117]
Metaboliti dell'ossido nitrico (NOx)	Livelli più elevati osservati nei pazienti affetti da AxSpA rispetto ai controlli, con livelli inferiori in quelli trattati con farmaci anti-TNF rispetto ai soli FANS.	[140]
Proteina oligomerica della matrice cartilaginea	Elevati livelli di COMP sono stati riportati in una varietà di malattie articolari infiammatorie, anche se l'associazione con altri marker clinici ed altri biomarker è incoerente.	[117]
YKL-40	I pazienti AS avevano elevati livelli di YKL-40 rispetto ai controlli, e dopo il trattamento con farmaci anti-TNF, i livelli sono tornati verso quelli normali, con persistenti riduzioni oltre i 3 anni.	[117]
Calprotectina	Livelli sierici di calprotectina significativamente aumentati in AxSpA, specialmente in quelli con gravità radiografica in peggioramento. Il trattamento con farmaci anti-TNF ha diminuito i livelli di calprotectina.	[133, 141–144]

## 6.4 Marcatori della gravità della progressione radiografica (Tabella 8)

Tabella 8 - Marcatori della gravità della progressione radiografica.

Proteina C-reattiva, VES	PCR elevata associata con la gravità radiografica su radiografia della colonna vertebrale e l'aumento di PCR e VES prevede la futura progressione radiografica delle articolazioni sacro-iliache e della colonna vertebrale in pazienti SA.	[150]
Fattore di crescita endotelio vascolare (VEGF)	I valori medi di VEGF basale erano significativamente più alti nei pazienti con peggioramento mSASSS di $\geq 2$ unità dopo 2 anni rispetto a quelli senza progressione e nei pazienti con formazione di sindesmofiti rispetto a quelli senza nuova formazione ossea.	[145-147]
Metalloproteinasi della matrice 3 MMP3	MMP nel siero è un predittore indipendente della progressione del danno strutturale in pazienti con spondilite anchilosante.	[144]
Cross-linking C-terminale del collagene di tipo I (CTX-I) e tipo II (CTX-II)	Il danno radiologico basale correlato con i livelli di CTX-II, ma non di CTX-I [59-61]. C'è stata una correlazione negativa tra CTX-I e BMD del trocantere. All'analisi multivariata, CTX-II ha contribuito significativamente e indipendentemente a spiegare la variazione dei danni radiologici e della progressione.	[148-150]
Filamenti circolanti di proteine da degradazione del tessuto cartilagineo e connettivo (C2M e C3M)	Il livelli di C2M e C3M erano significativamente più alti nei campioni di siero di pazienti AS rispetto ai controlli sani. Una combinazione di C2M e C3M, dicotomizzata secondo i migliori cut-off per i singoli marcatori, potrebbe identificare correttamente l'80% di quelli con progressione della malattia ed il 61% di quelli senza progressione. Necessita di ulteriori conferme.	[151]
Filamenti degradati di vimentina 99itrulli nata (VICM)	I livelli di VICM erano più elevati nei pazienti AS rispetto ai controlli sani, - quelli con più alti livelli di VICM avevano il punteggio mSASSS più alto. I livelli VICM erano associati con la progressione radiografica dopo 2 anni.	[149]
Sclerostina	I livelli sierici di sclerostina erano significativamente più bassi nei pazienti affetti da AS che in individui sani. Di particolare rilievo, i bassi livelli di sclerostina nel siero di pazienti con SA era significativamente associati con la formazione di nuovi sindesmofiti. Questo non è stato osservato in altri studi.	[135, 139, 152–155]
Dickkopf-1 (DKK-1)	I pazienti SA senza formazione di sindesmofiti hanno manifestato livelli significativamente più alti di Dkk1 suggeriscono che la segnalazione mite di Wnt sopprime la nuova formazione ossea e di conseguenza la crescita di sindesmofiti e l'anchilosì spinale.	[135, 139, 140, 155–158]
Osteoprotegerina (OPG)	I livelli di OPG erano più elevati nei pazienti AS rispetto ai controlli, e si sono ridotti in modo significativo dopo 3 mesi di terapia con anti-TNF- $\alpha$ .	[139, 158]

Osteocalcina	I livelli di osteocalcina erano più elevati nei pazienti AS rispetto ai controlli. Il livello di osteocalcina è aumentato dopo 6 mesi di terapia con anti-TNF- $\alpha$ .	[150, 159–161]
Fetua-A	I pazienti con sindesmofiti avevano livelli significativamente più elevati di Fetua-A, rispetto ai pazienti senza sindesmofiti ed i controlli. Tuttavia, Fetua-A non era differente tra i pazienti senza sindesmofiti ed i controlli.	[154]
Adipochine	I livelli sierici delle adipochine sono stati associati in maniera incoerente con l'attività della malattia. Uno studio ha mostrato un'associazione tra la lectina e la formazione di sindesmofiti ed un altro degli elevati livelli di visfatina con la progressione radiografica in SA.	[162-164]

#### 6.4.1 Fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF)

Il fattore di crescita vascolare endoteliale è un fattore di crescita legante l'eparina specifico delle cellule endoteliali vascolari che, in vivo, è in grado di indurre l'angiogenesi. È stato dimostrato che i livelli di VEGF sono elevati nei pazienti con SA e AxSpA [117, 122, 145 - 147], anche in quelli con malattia attiva [145] e sono più elevati nei pazienti con maggiore progressione radiografica (crescente punteggi mSASSS) [145] rispetto a quelli senza peggioramento.

#### 6.4.2 Filamenti proteici circolanti da degradazione del tessuto cartilagineo e connettivo

Uno studio ha mostrato che la variazione nel danno radiologico e la progressione correlata sono state spiegate dai livelli del collagene di tipo II (CTX-II) ma non di tipo I (CTX-I) [147, 148]. CTX-II era anche correlato con i marcatori sierologici dell'infiammazione.

Un altro studio ha trovato che i livelli di filamenti degradati di vimentina citrullinata (VICM) erano significativamente più alti nei pazienti AS rispetto ai controlli sani e che, i pazienti SA con i più alti

livelli di VICM ed un elevato mSASSS basale avevano il più alto rischio di progressione radiografica con la progressione che si è verificata nel 67% di questi pazienti [149].

In un altro esame che ha preso in considerazione la risonanza magnetica in pazienti AxSpA [150], i più alti punteggi di pretrattamento MRI di infiammazione di articolazioni SI e/o lombare della colonna vertebrale sono stati associati con i più alti livelli di CTX-II di base, ma non con i più alti livelli di altri biomarcatori di infiammazione e turnover osseo.

Due biomarcatori neoepitopi<sup>22</sup>:

- ✓ C2M, che misura un neoepitopo di collagene di tipo II generato da metalloproteinasi della matrice (MMP)
- ✓ C3M, un marker del turnover dei tessuti molli associati con l'infiammazione, che misura direttamente il rimodellamento tissutale

sono risultati elevati nei pazienti SA [151], ed in un rapporto, una combinazione di C2M e C3M è stato dicotomizzato secondo i migliori cut-off per singoli marcatori per predire l'80% di quelli che hanno avuto progressioni radiografiche e il 61% di quelli che non hanno avuto progressioni radiografiche.

---

<sup>22</sup> L'**epitopo** (o **determinante antigenico**) è quella piccola parte di antigene che lega l'anticorpo specifico. La singola molecola di antigene può contenere diversi epitopi riconosciuti da anticorpi differenti. Si distinguono, in linea di massima, due tipi di epitopi: 1 - epitopi sequenziali, caratterizzati da una specifica sequenza lineare aminoacidica (ad esempio Arg-Glu-Ser); epitopi conformazionali, riconosciuti dal sistema immunitario come complessi tridimensionali; 2 - epitopi conformazionali, che possono essere costituiti da elementi anche molto distanti tra loro in termini di struttura primaria (lineare), ma estremamente vicini a livello della struttura terziaria (tridimensionale) a causa del ripiegamento che caratterizza molte macromolecole biologiche.

### 6.4.3 Sclerostina

Sclerostina<sup>23</sup> e “noggin<sup>24</sup>” (NOG) sono antagonisti della proteina morfogenetica ossea (BMP) che modulano l'attività mitogenica attraverso il sequestro di BMP.

Gli studi dei livelli di sclerostina nei pazienti con SA sono stati contraddittori.

Un rapporto [152] ha dimostrato che l'espressione della sclerostina mediante analisi immunoistochimica di osteociti di pazienti tedeschi con SA è stata marcatamente ridotta (rispetto agli osteociti di individui sani e di pazienti affetti da artrite reumatoide (AR)) e che i livelli sierici della sclerostina erano significativamente più bassi nei pazienti con SA rispetto agli individui sani.

Di particolare rilievo, i bassi livelli sierici di sclerostina nei pazienti con SA, in questo studio, erano significativamente associati con la formazione di nuovi sindesmofiti.

Risultati simili sono stati osservati in altre due coorti di pazienti svedesi[139] e brasiliani[153] affetti da SA. Tuttavia, altri studi non hanno mostrato differenze od addirittura hanno dimostrato livelli elevati di sclerostina nei pazienti SA rispetto ai controlli di individui sani [135, 154, 155].

---

<sup>23</sup> La sclerostina è una proteina prodotta esclusivamente dagli osteociti ed in grado di inibire la neoformazione ossea sia da parte degli osteoblasti che degli osteociti; i suoi livelli circolanti diminuiscono con l'età e sono inibiti dal PTH. La sclerostina inibisce il pathway di segnale del sistema Wnt che svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella funzione delle cellule osteoblastiche.

<sup>24</sup> Noggin, noto anche come NOG, è una proteina che è coinvolta nello sviluppo di molti tessuti del corpo, tra tessuto nervoso, muscolare e osseo. Negli esseri umani è codificata dal gene NOG. La sequenza aminoacidica di NOG umano è altamente omologa a quella di ratto, topo, e *Xenopus* (un genere acquatica-rana).

#### 6.4.4 **Proteine wnt**

Le proteine wnt sono molecole di segnalazione extracellulari coinvolte nel controllo dello sviluppo embrionale.

Ci sono almeno due famiglie di inibitori secreti della segnalazione wnt: la famiglia di proteine secrete legate a frizzled, tutte dotate di un dominio N-terminale ricco di cisteina e sono recettori transmembrana, e la famiglia Dickkopf (tedesco per “grande testa” o “testardo”), che comprende Dkk1.

In generale, i livelli di Dkk1 sono stati descritti come inferiori nella maggior parte [139, 156 - 158], ma non tutti gli studi [135, 140]. Inoltre, è stato dimostrato che i pazienti SA senza formazione di sindesmofiti hanno livelli Dkk1 significativamente più alti, il che suggerisce che la segnalazione wnt mitigata sopprime la formazione di nuovo tessuto osseo e di conseguenza la crescita di sindesmofiti e anchilosi spinale [155, 156], anche se non sono stati influenzati da 3 mesi di terapia con anti-TNF- $\alpha$  [157].

In un altro studio [139], i pazienti con AS avevano livelli sierici di wnt-3a significativamente più elevati rispetto ai controlli.

#### 6.4.5 **Osteocalcina**

La proteina dell'osso contenente acido gamma-carbossi-glutammico (Gla) (BGLAP o BGP, altrimenti nota come osteocalcina) è una piccola molecola, altamente conservata associata alla matrice mineralizzata dell'osso.

Gli studi iniziali hanno mostrato che i livelli di osteocalcina sono inferiori [70], mentre recenti studi riportano livelli più elevati nei pazienti SA rispetto ai controlli, in particolare in quelli che sviluppavano nuovi sindesmofiti [150, 158, 160, 161] e aumento della densità minerale ossea [160]. Il livello di osteocalcina è aumentato dopo 3 mesi di terapia anti-TNF- $\alpha$ .

#### 6.4.6 Fosfatasi alcalina ossea (BAP)

La fosfatasi alcalina ossea (ALP osso) è un “marker” della formazione ossea attiva. Sono stati segnalati elevati livelli di fosfatasi alcalina ossea, sia pure in modo incoerente, in pazienti affetti da SA e AxSpA, anche se non sono state osservate variazioni nette dopo il trattamento [140, 148, 152, 155].

#### 6.4.7 Fetuina-A<sup>[25]</sup>

La famiglia della fetuina è parte della superfamiglia cistatina e comprende una serie di proteine strettamente correlate che sono state implicati in diverse funzioni, tra cui l'osteogenesi e il riassorbimento osseo, la regolamentazione di insulina e dei recettori del fattore di crescita degli epatociti, e la risposta all'infiammazione sistemica.

I pazienti SA con sindesmofiti hanno manifestato livelli significativamente più elevati di Fetuina-A rispetto ai pazienti senza sindesmofiti e controlli [154]. Tuttavia, i livelli di Fetuina-A non erano

---

<sup>25</sup> la Fetuina è un inibitore della calcificazione, inibisce la formazione e la deposizione de novo di calcio-fosfato senza alcun effetto sui cristalli di idrossiapatite già formati.



differenti tra i pazienti senza sindesmofiti e controlli, e nell'analisi di regressione, Fetuina-A è stato un significativo ed indipendente fattore predittivo della formazione di sindesmofiti.

#### 6.4.8 Adipochine

Le adipochine sono citochine (proteine della segnalazione cellulare) secrete dal tessuto adiposo che fanno da mediatori dell'omeostasi energetica, delle risposte immunitarie, e regolano la massa ossea. Rilevanti per la SA sono: adiponectina, resistina, leptina, visfatina, e apelina.

Il risultato è un incremento della crescita dell'osso corticale sia attraverso l'inibizione degli osteoclasti che attraverso la stimolazione degli osteoblasti.

Gli studi dei livelli di leptina nella SA sono stati contraddittori, alcuni mostrano un associazione con l'attività della malattia ed altri no [162]. Allo stesso modo, nessuna associazione coerente è stata identificata con la risposta al trattamento.

I livelli sierici di leptina sono stati associati con la formazione di sindesmofiti nei pazienti affetti da SA maschi [163].

Recentemente è stato trovato che i livelli sierici di resistina e visfatina sono elevati nei pazienti affetti da SA e gli elevati livelli di visfatina sono stati associati con conseguente progressione del danno radiologico nei pazienti affetti da SA [164].

## CONCLUSIONI

In questa Tesi ho cercato di descrivere i risultati di alcune ultime ricerche sull'impatto della SA sulla vita sociale e lavorativa dei soggetti affetti da questa malattia, sulla Genomica integrata e sui biomarcatori studiati per la SA, con particolare enfasi sui biomarcatori clinicamente utili, quali quelli dell'asse Interleuchina.

Da tutte le fonti e le pubblicazioni studiate abbiamo desunto l'importanza (non ancora sufficientemente attuata: da quanto letto risulterebbe un ritardo medio della diagnosi di SA è di 8 - 11 anni) della diagnosi precoce, della valutazione dell'attività della malattia e del monitoraggio della progressione radiografica della spondilite anchilosante (SA).

Tutto questo è reso difficile a causa di sintomi spesso vaghi, scarsità di dati clinici oggettivi, assenza di esami del sangue di conferma e la natura lentamente progressiva di questa malattia.

Per facilitare la diagnosi precoce della SA e l'appropriata selezione dei pazienti da trattare, è opportuno sviluppare ancora e tradurre nella pratica terapeutica l'attuale crescente interesse per la scoperta di biomarcatori. I biomarcatori possono essere utili anche per la misurazione accurata dell'attività della malattia, a predire la risposta al trattamento e predire la progressione radiografica nella SA.

A parte la proteina C-reattiva (PCR) e l'antigene leucocitario umano (HLA) -B27, che sono i biomarcatori comunemente usati per la SA, la maggior parte degli altri biomarcatori sono ancora in fase di ricerca e non sono ancora ampiamente utilizzati nella pratica clinica.

Gli ultimi anni hanno visto una progressivamente crescente comprensione della patogenesi della spondiloartrite in termini di genetica, percorsi (pathway) per l'infiammazione, formazione di nuovo tessuto osseo e turnover cartilagineo.

I nuovi biomarcatori descritti in queste ricerche danno l'opportunità di esplorare la loro applicazione nella diagnosi precoce, nel monitoraggio accurato dell'attività della malattia, a prevedere la risposta al trattamento e la progressione radiografica.

Il potenziale è promettente e grandi studi multicentrici prospettici uniformi, saranno utili a chiarire i biomarcatori clinicamente utili nel prossimo futuro.

Dopo tutte queste letture e dissertazioni, sono comunque giunta alla conclusione che è di grandissima importanza nella individuazione di questo tipo di malattie autoimmuni l'ambiente familiare e le persone che ti circondano.

Quattro delle principali sintomatologie (dolore al rachide lombare + rigidità articolare + dolore alle articolazioni del ginocchio + artrite periferica che in genere interessa in modo asimmetrico le grandi articolazioni degli arti inferiori) erano state indicate nella lettera inviata al Prof. Giorgi da parte dei miei genitori.

Avere intorno a te genitori, familiari, amici, conoscenti possessori di una cultura scientifica e universitaria è importantissimo nella individuazione precoce di queste malattie, già dai primi sintomi generali esteriori, in modo da effettuare subito quelle analisi specifiche alla loro individuazione e cura.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI E A PUBBLICAZIONI

- [1] Sengupta R, Stone MA. The assessment of ankylosing spondylitis in clinical practice. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3(9): 496e503.
- [2] Rudwaleit M, Landewe R, Van der Heijde D, et al. The development of assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann Rheum Dis* 2009;68(6):770e6.
- [3] Inman RD, Davis Jr JC, Heijde D, et al. Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Arthritis Rheum* 2008;58(11):3402e12.
- [4] Van der Heijde D, Landewe R, Einstein S, et al. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum* 2008;58(5):1324e31.
- [5] NSAS. Looking ahead e best practice for the care of people with SA. 2010. Available at: <http://www.nass.co.uk/campaigning/looking-ahead/> (accessed November 2014).
- [6] Beer G, James M. Ankylosing spondylitis: hard to say, hard to see, time to hear. May 2014. 2020 health report. Available at: <http://www.2020health.org/2020health/Publications/Publications-2014/A-S.html>.
- [7] Barlow JH, Wright CC, Williams B, et al. Work disability among people with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2001; 45(5):424e9.
- [8] Hamilton-West KE, Quine L. Living with ankylosing spondylitis: the patient's perspective. *J Health Psychol* 2009;14(6): 820e30.
- [9] Sieper J, Braun J, Rudwaleit M, et al. Ankylosing spondylitis: an overview. *Ann Rheum Dis* 2002;61(Suppl 3):iii8e18.
- [10] Boonen A, Chorus A, Miedema H, et al. Withdrawal from labour force due to work disability in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2001;60(11):1033e9.
- [11] Boonen A, Van der Heijde D, Landewe R, et al. Work status and productivity costs due to ankylosing spondylitis: comparison of three European countries. *Ann Rheum Dis* 2002;61(5):429e37.
- [12] Ward MM. Health-related quality of life in ankylosing spondylitis: a survey of 175 patients. *Arthritis Care Res e Off J Arthritis Health Prof Assoc* 1999;12(4):247e55.
- [13] Haywood KL, Garratt AM, Dziedzic K, et al. Patient centered assessment of ankylosing spondylitis-specific health related quality of life: evaluation of the patient generated index. *J Rheumatol* 2003;30(4):764e73.
- [14] Kobelt G, Andlin-Sobocki P, Maksymowych WP. Costs and quality of life of patients with ankylosing spondylitis in Canada. *J Rheumatol* 2006;33(2):289e95.
- [15] Kiltz U, Baraliakos X, Karakostas P, et al. Do patients with non-radiographic axial spondylarthritis differ from patients with ankylosing spondylitis? *Arthritis Care Res* 2012;64(9):1415e22.
- [16] Frauendorf R, Pinheiro Mde M, Ciconelli RM. Variables related to work productivity loss in patients with ankylosing spondylitis. *Rev Bras Reumatol* 2013;53(3):303e9.
- [17] Carette S, Graham D, Little H, et al. The natural disease course of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1983;26(2): 186e90.
- [18] Lubrano E, Helliwell P. Deterioration in anthropometric measures over six years in patients with ankylosing spondylitis. *Physiotherapy* 1999;85(3):138e43.
- [19] Marzo-Ortega H, McGonagle D, Jarrett S, et al. Infliximab in combination with methotrexate in active ankylosing spondylitis: a clinical and imaging study. *Ann Rheum Dis* 2005;64(11):1568e75.
- [20] Hider S, Wong M, Ortiz M, et al. Does a regular exercise program for ankylosing spondylitis influence body image? *Scand J Rheumatol* 2002;31(3):168e71.
- [21] Healey EL, Haywood KL, Jordan KP, et al. Impact of ankylosing spondylitis on work in patients across the UK. *Scand J Rheumatol* 2011;40(1):34e40.
- [22] Holloway I, Sofaer-Bennett B, Walker J. The stigmatisation of people with chronic back pain. *Disabil Rehabil* 2007;29(18): 1456e64.
- [23] Anderson R, Bury M. Living with chronic illness. The experiences of patients and their families. London: Unwin Hyman; 1988.
- [24] Zink A, Thiele K, Huscher D, et al. Healthcare and burden of disease in psoriatic arthritis. A comparison with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2006;33(1):86e90.
- [25] Boonen A, Van der Heijde D, Landewe R, et al. Direct costs of ankylosing spondylitis and its determinants: an analysis among three European countries. *Ann Rheum Dis* 2003;62(8):732e40.
- [26] Survey on work, NSAS data on File: RM 16094. November 2009.
- [27] Bevan S. Spondyloarthropathy and Work. A review of UK evidence. The Work Foundation; 2010.

- [28] Maksymowych WP, Gladman D, Rahman P, et al. The Canadian rheumatology association/spondyloarthritis research consortium of Canada treatment recommendations for the management of spondyloarthritis: a national multidisciplinary stakeholder project. *J Rheumatol* 2007;34(11):2273e84.
- [29] Tang K, Boonen A, Verstappen SM, et al. Worker productivity outcome measures: OMERACT filter evidence and agenda for future research. *J Rheumatol* 2014;41(1):165e76.
- [30] Reilly MC, Zbrozek SA, Dukes EM. The validity and reproducibility of a work productivity and activity impairment instrument. *PharmacoEconomics* 1993;4(5):353e65.
- [31] Gilworth G, Chamberlain MA, Harvey A, et al. Development of a work instability scale for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;49(3):349e54.
- [32] Gilworth G, Emery P, Barkham N, et al. Reducing work disability in ankylosing spondylitis: development of a work instability scale for SA. *BMC Musculoskelet Disord* 2009;10:68.
- [33] Barkham N, Coates LC, Keen H, et al. Double-blind placebo-controlled trial of etanercept in the prevention of work disability in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2010;69(11):1926e8.
- [34] Fabreguet I, Koumakis E, Burki V, et al. Assessment of work instability in spondyloarthritis: a cross-sectional study using the ankylosing spondylitis work instability scale. *Rheumatol Oxf Engl* 2012;51(2):333e7.
- [35] Osterhaus JT, Purcaru O. Discriminant validity, responsiveness and reliability of the arthritis-specific work productivity survey assessing workplace and household productivity within and outside the home in patients with axial spondyloarthritis, including non-radiographic axial spondyloarthritis and ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 2014;16(4): R164.
- [36] Osterhaus JT, Purcaru O, Richard L. Discriminant validity, responsiveness and reliability of the rheumatoid arthritis-specific work productivity survey (WPS-RA). *Arthritis Res Ther* 2009;11(3):R73.
- [37] Reilly MC, Gooch KL, Wong RL, et al. Validity, reliability and responsiveness of the work productivity and activity impairment questionnaire in ankylosing spondylitis. *Rheumatol Oxf Engl* 2010;49(4):812e9.
- [38] Lerner D, Amick 3rd BC, Rogers WH, et al. The work limitations questionnaire. *Med Care* 2001;39(1):72e85.
- [39] Verstappen SM, Fautrel B, Dadoun S, et al. Methodological issues when measuring paid productivity loss in patients with arthritis using biologic therapies: an overview of the literature. *Rheumatol Oxf Engl* 2012;51(2):216e29.
- [40] World Health Organisation. International classification of functioning, disability and Health: ICF. Geneva: World Health Organisation (WHO); 2001.
- [41] Karasek R, Brisson C, Kawakami N, et al. The job content questionnaire (JCQ): an instrument for internationally comparative assessments of psychosocial job characteristics. *J Occup Health Psychol* 1998;3(4):322e55.
- [42] Siegrist J, Peter R, Junge A, et al. Low status control, high effort at work and ischemic heart disease: prospective evidence from blue-collar men. *Soc Sci Med* (1982) 1990;31(10):1127e34.
- [43] Boonen A, Boone C, Albert A, et al. Understanding limitations in at-work productivity in patients with active ankylosing spondylitis: the role of work-related contextual factors. *J Rheumatol* 2015;42(1):93e100.
- [44] Ankylosing Spondylitis Association Ireland (ASAI). Supporting and understanding ankylosing spondylitis. Available at: [http://www.arthritisireland.ie/assets/0/ACFCE9C3-0645-4234-B7C4375B19E5E368\\_document/5577\\_AS\\_SUAS\\_tabbed\\_booklet\\_AW\\_Final.pdf](http://www.arthritisireland.ie/assets/0/ACFCE9C3-0645-4234-B7C4375B19E5E368_document/5577_AS_SUAS_tabbed_booklet_AW_Final.pdf).
- [45] Working for Health. Occupational therapy and how it can benefit your organization. College of Occupational Therapists; 2010. Available at: <http://www.cot.co.uk/sites/default/files/publications/public/Working-For Health.pdf>.
- [46] Allied Health Professions Federation (AHPF). reportAdvisory fitness for work report. Available at: [http://www.ahpf.org.uk/AHP\\_Advisory\\_Fitness\\_for\\_Work\\_Report.htm](http://www.ahpf.org.uk/AHP_Advisory_Fitness_for_Work_Report.htm).
- [47] Masi, A. T. Might axial myofascial properties and biomechanical mechanisms be relevant to ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis? *Arthritis Res. Ther.* **16**, 107, doi:10.1186/ar4532 (2014).
- [48] Choi, C. B. *et al.* ARTS1 polymorphisms are associated with ankylosing spondylitis in Koreans. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 582–584, doi:10.1136/ard.2008.105296 (2010).
- [49] Danoy, P. *et al.* Association of variants at 1q32 and STAT3 with ankylosing spondylitis suggests genetic overlap with Crohn's disease. *PLoS genetics* **6**, e1001195, doi:10.1371/journal.pgen.1001195 (2010).
- [50] Evans, D. M. *et al.* Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature genetics* **43**, 761–767, doi:10.1038/ng.873 (2011).
- [51] International Genetics of Ankylosing Spondylitis, C. *et al.* Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nature genetics* **45**, 730–738, doi:10.1038/ng.2667 (2013).
- [52] Uddin, M. *et al.* UGT2B17 copy number gain in a large ankylosing spondylitis multiplex family. *BMC genetics* **14**, 67, doi:10.1186/1471-2156-14-67 (2013).

- [53] Brown, M. A. Progress in the genetics of ankylosing spondylitis. *Briefings in functional genomics* **10**, 249–257, doi:10.1093/bfpg/elr023 (2011).
- [54] Visscher, P. M., Brown, M. A., McCarthy, M. I. & Yang, J. Five years of GWAS discovery. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 7–24, doi:10.1016/j.ajhg.2011.11.029 (2012).
- [55] Parkes, M., Cortes, A., van Heel, D. A. & Brown, M. A. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. *Nature reviews. Genetics* **14**, 661–673, doi:10.1038/nrg3502 (2013).
- [56] Uddin, M. *et al.* Brain-expressed exons under purifying selection are enriched for de novo mutations in autism spectrum disorder. *Nature genetics* **46**, 742–747, doi:10.1038/ng.2980 (2014).
- [57] O’Roak, B. J. *et al.* Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* **485**, 246–250, doi:10.1038/nature10989 (2012).
- [58] Parikshak, N. N. *et al.* Integrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism. *Cell* **155**, 1008–1021, doi:10.1016/j.cell.2013.10.031 (2013).
- [59] Willsey, A. J. *et al.* Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical projection neurons in the pathogenesis of autism. *Cell* **155**, 997–1007, doi:10.1016/j.cell.2013.10.020 (2013).
- [60] Stevens, A., Meyer, S., Hanson, D., Clayton, P. & Donn, R. P. Network analysis identifies protein clusters of functional importance in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R109, doi:10.1186/ar4559 (2014).
- [61] Hannum, G. *et al.* Genome-wide association data reveal a global map of genetic interactions among protein complexes. *PLoS genetics* **5**, e1000782, doi:10.1371/journal.pgen.1000782 (2009).
- [62] Perera, G. K. *et al.* Integrative biology approach identifies cytokine targeting strategies for psoriasis. *Science translational medicine* **6**, 223ra222, doi:10.1126/scitranslmed.3007217 (2014).
- [63] Rossin, E. J. *et al.* Proteins encoded in genomic regions associated with immune-mediated disease physically interact and suggest underlying biology. *PLoS genetics* **7**, e1001273, doi:10.1371/journal.pgen.1001273 (2011).
- [64] MacArthur, D. G. *et al.* A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science* **335**, 823–828, doi:10.1126/science.1215040 (2012).
- [65] Richette, P. *et al.* Psoriasis and phenotype of patients with early inflammatory back pain. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 566–571, doi:10.1136/annrheumdis-2012-201610 (2013).
- [66] Shivashankar, R. *et al.* Incidence of Spondyloarthritis in patients with ulcerative colitis: a population-based study. *J. Rheumatol.* **40**, 1153–1157, doi:10.3899/jrheum.121029 (2013).
- [67] Thjodleifsson, B., Geirsson, A. J., Bjornsson, S. & Bjarnason, I. A common genetic background for inflammatory bowel disease and ankylosing spondylitis: a genealogic study in Iceland. *Arthritis and rheumatism* **56**, 2633–2639, doi:10.1002/art.22812 (2007).
- [68] Wang, X., Lin, Z., Wei, Q., Jiang, Y. & Gu, J. Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis. *Rheumatology international* **29**, 1343–1347, doi:10.1007/s00296-009-0883-x (2009).
- [69] Duftner, C. *et al.* Preferential type 1 chemokine receptors and cytokine production of CD28- T cells in ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 647–653, doi:10.1136/ard.2005.042085 (2006).
- [70] Poddubnyy, D. A. *et al.* Relation of HLA-B27, tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter gene polymorphisms, and T cell cytokine production in ankylosing spondylitis – a comprehensive genotype-phenotype analysis from an observational cohort. *J. Rheumatol.* **38**, 2436–2441, doi:10.3899/jrheum.110130 (2011).
- [71] Bal, A. *et al.* Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF- $\alpha$  levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clinical rheumatology* **26**, 211–215, doi:10.1007/s10067-006-0283-5 (2007).
- [72] Nair, R. P. *et al.* Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF- $\kappa$ B pathways. *Nature genetics* **41**, 199–204, doi:10.1038/ng.311 (2009).
- [73] Wang, K. *et al.* Diverse genome-wide association studies associate the IL12/IL23 pathway with Crohn Disease. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 399–405, doi:10.1016/j.ajhg.2009.01.026 (2009).
- [74] Axtell, R. C. *et al.* T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nature medicine* **16**, 406–412, doi:10.1038/nm.2110 (2010).
- [75] Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M. & O’Shea, J. J. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **282**, 34605–34610, doi:10.1074/jbc.M705100200 (2007).
- [76] Sutton, C. E., Mielke, L. A. & Mills, K. H. IL-17-producing gammadelta T cells and innate lymphoid cells. *European journal of immunology* **42**, 2221–2231, doi:10.1002/eji.201242569 (2012).
- [77] Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature reviews. Immunology* **10**, 479–489, doi:10.1038/nri2800 (2010).
- [78] Flanagan, S. E. *et al.* Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nature genetics* **46**, 812–814, doi:10.1038/ng.3040 (2014).



- [79] Fu, W. *et al.* Analysis of 6,515 exomes reveals the recent origin of most human protein-coding variants. *Nature* **493**, 216–220, doi:10.1038/nature11690 (2013).
- [80] Neale, B. M. *et al.* Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* **485**, 242–245, doi:10.1038/nature11011 (2012).
- [81] Sanders, S. J. *et al.* De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* **485**, 237–241, doi:10.1038/nature10945 (2012).
- [82] Iossifov, I. *et al.* De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* **74**, 285–299, doi:10.1016/j.neuron.2012.04.009 (2012).
- [83] Jiang, Y. H. *et al.* Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 249–263, doi:10.1016/j.ajhg.2013.06.012 (2013).
- [84] O’Roak, B. J. *et al.* Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nature genetics* **43**, 585–589, doi:10.1038/ng.835 (2011).
- [85] Martin, A. R. *et al.* Transcriptome sequencing from diverse human populations reveals differentiated regulatory architecture. *PLoS genetics* **10**, e1004549, doi:10.1371/journal.pgen.1004549 (2014).
- [86] Kim, M. S. *et al.* A draft map of the human proteome. *Nature* **509**, 575–581, doi:10.1038/nature13302 (2014).
- [87] Zuberi, K. *et al.* GeneMANIA prediction server 2013 update. *Nucleic acids research* **41**, W115–122, doi:10.1093/nar/gkt533 (2013).
- [88] Halldorsson, B. V. & Sharan, R. Network-based interpretation of genomic variation data. *J. Mol. Biol.* **425**, 3964–3969, doi:10.1016/j.jmb.2013.07.026 (2013).
- [89] Koh, G. C., Porras, P., Aranda, B., Hermjakob, H. & Orchard, S. E. Analyzing protein-protein interaction networks. *J. Proteome. Res.* **11**, 2014–2031, doi:10.1021/pr201211w (2012).
- [90] Weisman MH, Witter JP, Reveille JD. The prevalence of inflammatory back pain: population-based estimates from the US National Health and Nutrition Examination Survey, 2009–10. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(3):369–373.
- [91] Rudwaleit M, Metter A, Listing J, Sieper J, Braun J. Inflammatory back pain in ankylosing spondylitis: a reassessment of the clinical history for application as classification and diagnostic criteria. *Arthritis Rheum.* 2006;54(2):569–578.
- [92] Reveille JD, Witter JP, Weisman MH. Prevalence of axial spondyloarthritis in the United States: estimates from a cross-sectional survey. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2012;64(6):905–910.
- [93] Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 1994;21(12):2286–2291.
- [94] Van der Heijde D, Lie E, Kvien TK, Sieper J, Van den Bosch F, Listing J, Braun J, Landewé R. ASDAS, a highly discriminatory ASAS-endorsed disease activity score in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(12):1811–1818.
- [95] Calin A, Garrett S, Whitelock H, Kennedy LG, O’Hea J, Mallorie P, Jenkinson T. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J Rheumatol.* 1994;21(12):2281–2285.
- [96] Van der Heijde D, Landewé R. Selection of a method for scoring radiographs for ankylosing spondylitis clinical trials, by the Assessment in Ankylosing Spondylitis Working Group and OMERACT. *J Rheumatol.* 2005;32(10):2048–2049.
- [97] Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 1984;27(4):361–368.
- [98] Rudwaleit M, Khan MA, Sieper J. The challenge of diagnosis and classification in early ankylosing spondylitis: do we need new criteria? *Arthritis Rheum.* 2005;52(4):1000–1008.
- [99] McGonagle D. A proposed classification of the immunological diseases. *PLOS Med* 2006; 3:e297.
- [100] Haroon N, Inman RD, Learch TJ, Weisman MH, Lee M, Rahbar MH, et al. The impact of TNF-inhibitors on radiographic progression in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2013;65(10):2645–2654.
- [101] Reveille JD, Hirsch R, Dillon CF, Carroll MD, Weisman MH. The prevalence of HLA-B27 in the US: data from the US National Health and Nutrition Examination Survey, 2009. *Arthritis Rheum.* 2012;64(5):1407–1411.
- [102] Bennett AN, McGonagle D, O’Connor P, Hensor EM, Sivera F, Coates LC, et al. Severity of baseline magnetic resonance imaging-evident sacroiliitis and HLA-B27 status in early inflammatory back pain predict radiographically evident ankylosing spondylitis at eight years. *Arthritis Rheum.* 2008;58(11):3413–3418.
- [103] Sieper J, Srinivasan S, Zamani O, Mielants H, Choquette D, Pavelka K, et al. Comparison of two referral strategies for diagnosis of axial spondyloarthritis: the Recognising and Diagnosing Ankylosing Spondylitis Reliably (RADAR) study. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(10):1621–1627.
- [104] Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, Leo P, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet.* 2013;45(7):730–738.
- [105] Annas GJ, Elias S. 23andMe and the FDA. *N Engl J Med.* 2014;370:985–988.

- [106] Robinson PC, Claushuis TA, Cortes A, Martin TM, Evans DM, Leo P, et al. Genetic dissection of acute anterior uveitis reveals similarities and differences in associations observed with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(1):140–151.
- [107] Cortes A, Maksymowycz WP, Wordsworth BP, Inman RD, Danoy P, Rahman P, et al. Association study of genes related to bone formation and resorption and the extent of radiographic change in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2014 doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204835. Epub ahead of print.
- [108] Spoorenberg A, Van der Heijde D, de Klerk E, Dougados M, de Vlam K, Mielants H, van der Tempel H, van der Linden S. Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 1999;26(4):980–984.
- [109] Ruof J, Stucki G. Validity aspects of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in ankylosing spondylitis: a literature review. *J Rheumatol.* 1999;26(4):966–970.
- [110] Rudwaleit M, Haibel H, Baraliakos X, Listing J, Marker-Hermann E, Zeidler H, et al. The early disease stage in axial spondylarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Arthritis Rheum.* 2009;60(3):717–727.
- [111] Wallis D, Haroon N, Ayearst R, Carty A, Inman RD. Ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis: part of a common spectrum or distinct diseases? *J Rheumatol.* 2013;40(12):2038–2041.
- [112] Bredella MA, Steinbach LS, Morgan S, Ward M, Davis JC. MRI of the sacroiliac joints in patients with moderate to severe ankylosing spondylitis. *AJR Am J Roentgenol.* 2006;187(6):1420–1426.
- [113] Poddubnyy DA, Rudwaleit M, Listing J, Braun J, Sieper J. Comparison of a high sensitivity and standard C reactive protein measurement in patients with ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(7):1338–1341.
- [114] Gratacós J, Collado A, Filella X, Sanmartí R, Cañete J, Llena J, Molina R, Ballesta A, Muñoz-Gómez J. Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol.* 1994;33(10):927–931.
- [115] Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA and the environment. *Arthritis Rheumatol* 2007; 40:1823–8.
- [116] Romero-Sanchez C, Jaimes DA, Londoño J, De Avila J, Castellanos JE, Bello JM, Bautista W, Valle-Oñate R. Association between Th-17 cytokine profile and clinical features in patients with spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29(5):828–834.
- [117] Pedersen SJ, Sørensen IJ, Garner P, Johansen JS, Madsen OR, Tvede N, et al. ASDAS, BASDAI and different treatment responses and their relation to biomarkers of inflammation, cartilage and bone turnover in patients with axial spondyloarthritis treated with TNF $\alpha$  inhibitors. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(8):1375–1381.
- [118] Sveaas SH, Berg IJ, Provan SA, Semb AG, Olsen IC, Ueland T, et al. Circulating levels of inflammatory cytokines and cytokine receptors in patients with ankylosing spondylitis: a cross-sectional comparative study. *Scand J Rheumatol.* 2015;44(2):118–124.
- [119] Mei Y, Pan F, Gao J, Ge R, Duan Z, Zeng Z, et al. Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2011;30(2):269–273.
- [120] Chen WS, Chang YS, Lin KC, Lai CC, Wang SH, Hsiao KH, et al. Association of serum interleukin-17 and interleukin-23 levels with disease activity in Chinese patients with ankylosing spondylitis. *J Chin Med Assoc.* 2012;75(7):303–308.
- [121] Andersen T, Rasmussen TK, Hvid M, Holm CK, Madsen KJ, Jurik AG, et al. Increased plasma levels of IL-21 and IL-23 in spondyloarthritis are not associated with clinical and MRI findings. *Rheumatol Int.* 2012;32(2):387–393.
- [122] Li XL, Lin TT, Qi CY, Yuan L, Xia LP, Shen H, Lu J. Elevated serum level of IL-33 and sST2 in patients with ankylosing spondylitis: associated with disease activity and vascular endothelial growth factor. *J Invest Med.* 2013;61(5):848–851.
- [123] Li GX, Wang S, Duan ZH, Zeng Z, Pan FM. Serum levels of IL-33 and its receptor ST2 are elevated in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol.* 2013;42(3):226–231.
- [124] Han GW, Zeng LW, Liang CX, Cheng BL, Yu BS, Li HM, Zeng FF, Liu SY. Serum levels of IL-33 is increased in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2011;30(12):1583–1588.
- [125] Keyszer G, Lambiri I, Nagel R, Keyszer C, Keyszer M, Gromnica-Ihle E, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J Rheumatol.* 1999;26(2):251–258.
- [126] Chen CH, Lin KC, Yu DT, Yang C, Huang F, Chen HA, et al. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ankylosing spondylitis: MMP-3 is a reproducibly sensitive and specific biomarker of disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(4):414–420.
- [127] Matthey DL, Packham JC, Nixon NB, Coates L, Creamer P, Hailwood S, Taylor GJ, Bhalla AK. Association of cytokine and matrix metalloproteinase profiles with disease activity and function in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(3):R127.
- [128] Yang C, Gu J, Rihl M, Baeten D, Huang F, Zhao M, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase 3 and macrophage colony-stimulating factor 1 correlate with disease activity in ankylosing spondylitis. *Arthritis*



Rheum. 2004;51(5):691–699.

- [129] Wendling D, Cedoz JP, Racadot E. Serum levels of MMP-3 and cathepsin K in patients with ankylosing spondylitis: effect of TNF alpha antagonist therapy. *Joint Bone Spine*. 2008;75(5):559–562.
- [130] Sun S, Bay-Jensen AC, Karsdal MA, Siebuhr AS, Zheng Q, Maksymowych WP, Christiansen TG, Henriksen K. The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;19(15):93. doi: 10.1186/1471-2474-15-93.
- [131] Woo JH, Lee HJ, Sung IH, Kim TH. Changes of clinical response and bone biochemical markers in patients with ankylosing spondylitis taking etanercept. *J Rheumatol*. 2007;34(8):1753–1759.
- [132] Arends S, van der Veer E, Groen H, Houtman PM, Jansen TL, Leijnsma MK, et al. Serum MMP-3 level as a biomarker for monitoring and predicting response to etanercept treatment in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2011;38(8):1644–1650.
- [133] Turina MC, Yeremenko N, Paramarta JE, De Rycke L, Baeten D. Calprotectin (S100A8/9) as serum biomarker for clinical response in proof-of-concept trials in axial and peripheral spondyloarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(4):413. doi: 10.1186/s13075-014-0413-4.
- [134] Maksymowych WP, Landewé R, Conner-Spady B, Dougados M, Mielants H, van der Tempel H, Poole AR, Wang N, Van der Heijde D. Serum matrix metalloproteinase 3 is an independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):1846–1853.
- [135] Taylan A, Sari I, Akinci B, Bilge S, Kozaci D, Akar S, et al. Biomarkers and cytokines of bone turnover: extensive evaluation in a cohort of patients with ankylosing spondylitis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012;13:191. doi: 10.1186/1471-2474-13-191.
- [136] Franck H, Meurer T, Hofbauer LC. Evaluation of bone mineral density, hormones, biochemical markers of bone metabolism, and osteoprotegerin serum levels in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2004;31(11):2236–2241.
- [137] Genre F, López-Mejías R, Miranda-Filloo JA, Ubilla B, Carnero-López B, Palmou-Fontana N, et al. Osteoprotegerin correlates with disease activity and endothelial activation in non-diabetic ankylosing spondylitis patients undergoing TNF- $\alpha$  antagonist therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(5):640–646.
- [138] Chen CH, Chen HA, Liao HT, Liu CH, Tsai CY, Chou CT. Soluble receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in ankylosing spondylitis: OPG is associated with poor physical mobility and reflects systemic inflammation. *Clin Rheumatol*. 2010;29(10):1155–1161.
- [139] Klingberg E, Nurkka M, Carlsten H, Forsblad-d’Elia H. Biomarkers of bone metabolism in ankylosing spondylitis in relation to osteoproliferation and osteoporosis. *J Rheumatol*. 2014;41(7):1349–1356.
- [140] De Andrade KR, de Castro GR, Vicente G, da Rosa JS, Nader M, Pereira IA, Fröde TS. Evaluation of circulating levels of inflammatory and bone formation markers in axial spondyloarthritis. *Int Immunopharmacol*. 2014;21(2):481–486.
- [141] Matzkies FG, Targan SR, Berel D, Landers CJ, Reveille JD, McGovern DP, Weisman MH. Markers of intestinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis: a pilot study. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R261. doi: 10.1186/ar4106.
- [142] Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Wculek SK, Ruppen I, Ximenez-Embun P, Guio-Carrion A, Navarro R, Hogg N, Ashman K, Wagner EF. S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3. *Immunity*. 2013;39:1171–1181.
- [143] Hammer HB, Kvien TK, Glennäs A, Melby K. A longitudinal study of calprotectin as an inflammatory marker in patients with reactive arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 1995;13(1):59–64.
- [144] Turina MC, Sieper J, Yeremenko N, Conrad K, Haibel H, Rudwaleit M, Baeten D, Poddubnyy D. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(9):1746–1748.
- [145] Drouart M, Saas P, Billot M, Cedoz JP, Tiberghien P, Wendling D, Toussiot E. High serum vascular endothelial growth factor correlates with disease activity of spondylarthropathies. *Clin Exp Immunol*. 2003;132(1):158–162.
- [146] Poddubnyy D, Conrad K, Haibel H, Syrbe U, Appel H, Braun J, Rudwaleit M, Sieper J. Elevated serum level of the vascular endothelial growth factor predicts radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(12):2137–2143.
- [147] Vosse D, Landewé R, Garnero P, Van der Heijde D, Van der Linden S, Geusens P. Association of markers of bone- and cartilage-degradation with radiological changes at baseline and after 2 years follow-up in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(8):1219–1222.
- [148] Arends S, Spoorenberg A, Efde M, Bos R, Leijnsma MK, Bootsma H, et al. Higher bone turnover is related to spinal radiographic damage and low bone mineral density in ankylosing spondylitis patients with active disease: a cross-sectional analysis. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e99685. doi: 10.1371/journal.pone.0099685.
- [149] Bay-Jensen AC, Karsdal MA, Vassiliadis E, Wichuk S, Marcher-Mikkelsen K, Lories R, Christiansen C, Maksymowych WP. Circulating citrullinated vimentin fragments reflect disease burden in ankylosing spondylitis and have prognostic capacity for radiographic progression. *Arthritis Rheum*. 2013;65(4):972–980.
- [150] Pedersen SJ, Sørensen IJ, Lambert RG, Hermann KG, Garnero P, Johansen JS, et al. Radiographic progression is associated with resolution of systemic inflammation in patients with axial spondylarthritis

treated with tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibitors: a study of radiographic progression, inflammation on magnetic resonance imaging, and circulating biomarkers of inflammation, angiogenesis, and cartilage and bone turnover. *Arthritis Rheum.* 2011;63(12):3789–3800.

[151] Bay-Jensen AC, Wichuk S, Byrjalsen I, Leeming DJ, Morency N, Christiansen C, Karsdal MA, Maksymowych WP. Circulating protein fragments of cartilage and connective tissue degradation are diagnostic and prognostic markers of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *PLoS ONE.* 2013;8(1):e54504. doi: 10.1371/journal.pone.0054504.

[152] Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, Zwerina J, Herrmann M, Mueller R, et al. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(11):3257–3262.

[153] Saad CG, Ribeiro AC, Moraes JC, Takayama L, Goncalves CR, Rodrigues MB, et al. Low sclerostin levels: a predictive marker of persistent inflammation in ankylosing spondylitis during anti-tumor necrosis factor therapy? *Arthritis Res Ther.* 2012;14(5):R216. doi: 10.1186/ar4055.

[154] Tuylu T, Sari I, Solmaz D, Kozaci DL, Akar S, Gunay N, Onen F, Akkoc N. Fetuin-A is related to syndesmophytes in patients with ankylosing spondylitis: a case control study. *Clinics (Sao Paulo)* 2014;69(10):688–693.

[155] Korkosz M, Gąsowski J, Leszczyński P, Pawlak-Buś K, Jeka S, Kucharska E, Grodzicki T. High disease activity in ankylosing spondylitis is associated with increased serum sclerostin level and decreased wingless protein-3a signaling but is not linked with greater structural damage. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:99. doi: 10.1186/1471-2474-14-99.

[156] Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, Zwerina J, Hueber A, Haibel H, et al. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(4):572–574.

[157] Yucong Z, Lu L, Shengfa L, Yongliang Y, Ruguo S, Yikai L. Serum functional dickkopf-1 levels are inversely correlated with radiographic severity of ankylosing spondylitis. *Clin Lab.* 2014;60(9):1527–1531.

[158] Kwon SR, Lim MJ, Suh CH, Park SG, Hong YS, Yoon BY, et al. Dickkopf-1 level is lower in patients with ankylosing spondylitis than in healthy people and is not influenced by anti-tumor necrosis factor therapy. *Rheumatol Int.* 2012;32(8):2523–2527.

[159] Franck H, Keck E. Serum osteocalcin and vitamin D metabolites in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 1993;52(5):343–346.

[160] Yilmaz N, Ozaslan J. Biochemical bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2000;19(2):92–98.

[161] Visvanathan S, Van der Heijde D, Deodhar A, Wagner C, Baker DG, Han J, et al. Effects of infliximab on markers of inflammation and bone turnover and associations with bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:175–182.

[162] Genre F, López-Mejías R, Miranda-Filloy JA, Ubilla B, Carnero-López B, Blanco R, Pina T, González-Juanatey C, Llorca J, González-Gay MA. Adipokines, biomarkers of endothelial activation, and metabolic syndrome in patients with ankylosing spondylitis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:860651. doi: 10.1155/2014/860651.

[163] Kim KJ, Kim JY, Park SJ, Yoon H, Yoon CH, Kim WU, Cho CS. Serum leptin levels are associated with the presence of syndesmophytes in male patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 2012;31(8):1231–1238.

[164] Syrbe U, Callhoff J, Conrad K, Poddubnyy D, Haibel H, Junker S, et al. Serum adipokine levels in patients with ankylosing spondylitis and their relationship to clinical parameters and radiographic spinal progression. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(3):678–685.

[165] Evans DM, Spencer CCA, Pointon JJ et al. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet* 2011; 43:761–7.

[166] Costello ME, Elewant D, Kenna JJ, Brown MA. Microbiomes, the gut and ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 2013; 15:214.

[167] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:652–7.

[168] Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:337–48.

[169] Park H, Li Z, Yang XO et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6:1133–41.

[170] Yen D, Cheung J, Scheerens H et al. IL-23 is essential for T cell mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 2006; 116:1310–6.

[171] Piper C, Pesenacker AM, Bending D et al. T cell expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in juvenile arthritis is contingent upon Th17 plasticity. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66:1955–60.

- [172] Oppmann B, Lesley R, Blom B et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000; 13:715–25.
- [173] Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003; 278:1910–4.
- [174] Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP et al. IL-23 induces spondyloarthritis by acting on ROR $\gamma$ 1 CD31 CD4–CD8–entheseal resident T cells. *Nat Med* 2012; 18:1069–76.
- [175] Hue S, Ahern P, Buonocore S et al. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; 203:2473–83.
- [176] Di Meglio P, Nestle FO. The role of IL-23 in the immunopathogenesis of psoriasis. *F1000 Biol Rep* 2010; 2:40.
- [177] Cua DJ, Sherlock J, Chen Y et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421:744–8.
- [178] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24:179–89.
- [179] Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S et al. Requirement of interleukin-17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001; 194:519–27.
- [180] Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D et al. Pathogen-induced human Th17 cells produce IFN- $\gamma$  or IL-10 are regulated by IL-1 $\beta$ . *Nature* 2012; 484:514–8.
- [181] Chen Y, Langrish CL, McKenzie B et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2006; 116:1317–26.
- [182] Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201:233–40.
- [183] Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 116:1218–22.
- [184] Blauvelt A. T-helper 17 cells in psoriatic plaques and additional genetic links between IL-23 and psoriasis. *J Invest Dermatol* 2008; 128:1064–7.
- [185] Chan JR, Blumenschein W, Murphy E et al. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med* 2006; 203:2557–87.
- [186] Kopp T, Lenz P, Bello-Fernandez C, Kastelein RA, Kupper TS, Stingl G. IL-23 production by cosecretion of endogenous p19 and transgenic p40 in keratin 14/p40 transgenic mice: evidence for enhanced cutaneous immunity. *J Immunol* 2003; 170:5438–44.
- [187] Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 29–37.
- [188] Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003; 171:6173–7.
- [189] Murphy CA, Langrish CL, Chen Y et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003; 198:1951–7.
- [190] Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM et al. Cutting edge: mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2010; 184:3336–40.
- [191] Noordenbos T, Yeremenko N, Gofita I et al. Interleukin-17-positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondylarthritis. *Arthritis Rheumatol* 2001; 64:99–109.
- [192] Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheumatol* 2004; 50:650–9.
- [193] Davidson SI, Liu Y, Danoy PA et al. Association of STAT3 and TNFRSF1A with ankylosing spondylitis in Han Chinese. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:289–92.
- [194] Brown MA, Pile KD, Kennedy LG et al. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann Rheum Dis* 1996; 55:268–70.
- [195] Bowness P. Overview of Ankylosing Spondylitis Genetics and Pathogenesis. Available at: [http://www.rheumatology.org.uk/includes/documents/cm\\_docs/2012/1/1400\\_overview\\_of\\_ankylosing\\_spondylitis\\_genetics\\_and\\_pathogenesis.pdf](http://www.rheumatology.org.uk/includes/documents/cm_docs/2012/1/1400_overview_of_ankylosing_spondylitis_genetics_and_pathogenesis.pdf) (accessed 1 January 2015).
- [196] Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. Recurrence risk modeling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:883–6.
- [197] Chou CT, Timms AE, Wei JCC, Tsai WC, Wordsworth BP, Brown MA. Replication of association of IL1 gene complex members with ankylosing spondylitis in Taiwanese Chinese. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:1106–9.
- [198] Cortes A, Hadler J, Pointon JP et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet* 2013; 45:730–8.
- [199] Davidson SI, Wu X, Liu Y et al. Association of ERAP1, but not IL23R, with ankylosing spondylitis in a Han Chinese population. *Arthritis Rheum* 2009; 60:3263–8.

- [200] Jadon D, Tillett W, Wallis D et al. Exploring ankylosing spondylitis-associated ERAP1, IL23R and IL12B gene polymorphisms in subphenotypes of psoriatic arthritis. *Rheumatology* 2013; 52:261–6.
- [201] Di Meglio P, Di Cesare A, Laggner U et al. The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLOS ONE* 2011; 6:e17160.
- [202] Chan AT, Kollnberger SD, Wedderburn LR, Wordsworth BP. Expansion and enhanced survival of natural killer cells expressing the killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL2 in spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3586–95.
- [203] Appel H, Maier R, Wu P et al. Analysis of IL-171 cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response. *Arthritis Res Ther* 2011; 13:95.
- [204] DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment IL-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2633–43.
- [205] Payeli SK, Kollnberger S, Maroguin Belaunzaran O et al. Inhibiting HLA-B27 homodimer-driven immune cell inflammation in spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64:3139–49.
- [206] Baeten D, Baraliakos X, Braun J et al. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2013; 382:1705–13.
- [207] Braun J, Brandt J, Listing J et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a randomised controlled multicentre trial. *Lancet* 2002; 359:1187–93.
- [208] Baeten DL, Braun J, Baraliakios et al. Secukinumab, a monoclonal antibody to interleukin-17A, significantly improves signs and symptoms of active ankylosing spondylitis: results of a 52-week phase 3 randomized placebo-controlled trial with intravenous loading and subcutaneous maintenance dosing. *Arthritis Rheum* 2014; 66 (Suppl. 1): ACR Abstract no. 819.
- [209] Deodhar AA, Baeten DL, Braun J et al. Secukinumab, a monoclonal antibody to interleukin-17A, significantly improves physical function and quality of life in subjects with active ankylosing spondylitis: results of a phase 3 randomized, placebo-controlled trial with intravenous loading and subcutaneous maintenance dosing. *Arthritis Rheum* 2014; 66 (Suppl. 1): ACR Abstract no. 538.
- [210] Poddubnyy D, Hermann KG, Calhoffs J, Listing J, Sieper J. Ustekinumab for the treatment of patients with active ankylosing spondylitis: results of a 28-week, prospective, open-label, proof-of-concept study (TOPAS). *Ann Rheum Dis* 2014; 73:817–23.
- [211] Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 T helper cells. *Cell* 2006; 126:1121–33.
- [212] Uddin M, Codner D, Hasan SM, Scherer SW, O'Rielly DD, Rahman P. Integrated genomics identifies convergence of ankylosing spondylitis with global immune mediated disease pathways. *Sci Rep.* 2015 May 18;5:10314. doi: 10.1038/srep10314.
- [213] Jethwa H, Bowness P. The interleukin (IL)-23/IL-17 axis in ankylosing spondylitis: new advances and potentials for treatment. *Clin Exp Immunol.* 2016 Jan;183(1):30-6. doi: 10.1111/cei.12670. Epub 2015 Sep 30. Review. PMID: 26080615
- [214] Reveille JD Biomarkers for diagnosis, monitoring of progression, and treatment responses in ankylosing spondylitis and axial spondyloarthritis. *Clin Rheumatol.* 2015 Jun;34(6):1009-18. doi: 10.1007/s10067-015-2949-3. Epub 2015 May 5.
- [215] J Martindale, R Shukla, J Goodacre The impact of ankylosing spondylitis/axial spondyloarthritis on work productivity. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 29 (2015) 512 - 523